Aus dem Lehrstuhl für Klinische Biochemie
der Universität Düsseldorf
(Professor Dr. med. H. Reinauer)

AUTORADIOGRAPHISCHER NACHWEIS VON INSULIN-REZEPTOR KOMPLEXEN AUF OBERFLÄCHEN ISOLIERTER ZELLEN

Habilitationsschrift

Der hohen Medizinischen Fakultät der Universität Düsseldorf
zur Erlangung der Venia legendi für das Fach

Cytobiologie

vorgelegt von

Dr. phil. Erika Junger

1979

1980

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41543910_0015

Aus dem Lehrstuhl für Klinische Biochemie
der Universität Düsseldorf
(Professor Dr. med. H. Reinauer)

AUTORADIOGRAPHISCHER NACHWEIS VON INSULIN-REZEPTOR KOMPLEXEN AUF OBERFLÄCHEN ISOLIERTER ZELLEN

Habilitationsschrift

Der hohen Medizinischen Fakultät der Universität Düsseldorf
zur Erlangung der Venia legendi für das Fach

Cytobiologie

vorgelegt von

Dr. phil. Erika Junger

1979

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

I N H A L T S V E R Z E I C H N I S

		Seite
I	Einleitung	1
II	Methodische Basis des autoradiographischen Rezeptornachweises	9
	1. Allgemeine Überlegungen	9
	2. Zytologische Techniken	12
	2.1 Insulinbindung	14
	2.2 Abtrennung des freien Insulins	16
	2.3 Glutaraldehydfixierung	18
	2.4 Herstellung der Zellausstriche	19
	3. Autoradiographische Techniken	21
	3.1 Radioaktiver Zerfall von ^{125}J	21
	3.2 Präparatgeometrie	21
	3.3 Beschichtung der Präparate mit Emulsion	25
	3.4 Exposition und Weiterverarbeitung der Präparate	31
	3.5 Analyse der Autoradiogramme von Zellausstrichen	31
	3.6 Autoradiogramme von Semidünnschnitten	40
	3.7 Berechnung der Anzahl der Insulin-Rezeptor Komplexe aus der Silberkorndichte	41
	4. Kurze Zusammenfassung von Abschnitt II	42
III	Ergebnisse	44
	1. Nachweis von Insulin-Rezeptor Komplexen auf isolierten Leberzellen	44
	1.1 Fragestellung	44
	1.2 Isolierung der Leberzellen	46
	1.3 Morphologische Charakterisierung der Zellpopulation	46
	1.4 Insulinbindung der isolierten Leberzellen (Markierung der Zellen für die Autoradiographie)	49
	1.5 Autoradiographie von Zellausstrichpräparaten (Lichtmikroskopische Analyse)	57
	1.6 Autoradiographie von Semidünnschnitten	65

Seite

1.7 Kurze Zusammenfassung der autoradiographischen Ergebnisse 68

2. Nachweis von Insulin-Rezeptor Komplexen auf Monozyten 69

2.1 Fragestellung 69

2.2 Isolierung von mononukleären Leukozyten 70

2.3 Morphologische Charakterisierung der Lymphozyten/Monozyten Population 74

2.4 Insulin Bindung an Lymphozyten/Monozyten (Markierung der Zellen für die Autoradiographie) 80

2.5 Autoradiographie von Zellausstrichpräparaten (Lichtmikroskopische Analyse) 82

2.6 Autoradiographie von Semidünnschnitten 88

2.7 Kurze Zusammenfassung der autoradiographischen Ergebnisse 90

IV Diskussion 91

1. Validität der Methode 91

2. Erzielte Informationen über die Insulinbindung an Zellen 99

V Zusammenfassung 107

VI Literatur 112

VII Anhang 121

1. Radioisotope 121

2. Insuline 121

3. Chemikalien 121

4. Photochemikalien 121

5. Pufferlösungen 122

6. Gradientenmedien 123

7. Versuchsansätze zur Insulinbindung 123

I EINLEITUNG

Das Konzept der Effektor-Rezeptor-Wechselwirkung dient, seit es Ende des letzten Jahrhunderts formuliert wurde (LANGLEY 1878 EHRLICH,1909), in der Pharmakologie als Grundlage für Untersuchungen über den Wirkungsmechanismus einer Reihe von Drogen.

Der Vorschlag, daß auch Insulin über einen Rezeptor seine Wirkung entfalten könnte (HECHTER 1965; LEVINE 1965), wurde von CUATRECASAS 1971 aufgegriffen. Aufgrund seiner Untersuchungen über die Bindung von ^{125}J-Insulin an die Plasmamembran von Fettzellen postulierte er einen Insulinrezeptor. CUATRECASAS hat damit eine Forschungsrichtung initiiert, der sich inzwischen zahlreiche Arbeitsgruppen mit Untersuchungen über die Insulin-Rezeptor-Wechselwirkung angeschlossen haben. Detaillierte Übersichten über bisherige Studien finden sich bei ROTH (1973), CUATRECASAS und HOLLENBERG (1976), FREYCHET (1976), DE MEYTS (1976 a) und KAHN (1976).

In Kürze stellt sich der derzeitige Stand unserer Kenntnisse wie folgt dar:

Die Kinetik der Insulinbindung und die Anzahl der im Gleichgewicht besetzten Bindungsstellen sind abhängig von der Temperatur, vom pH-Wert der Lösung und der Hormonkonzentration. Bei steigender Hormonkonzentration strebt die Bindung von Insulin an den Rezeptor einer Sättigung zu. Sie ist reversibel. Andere Peptidhormone konkurrieren mit dem nativen Insulin nicht oder

können Insulin nur zum Teil verdrängen. Neben der spezifischen Bindung des Insulins an den Rezeptor wird eine unspezifische Bindung, die nicht am Rezeptor stattfindet, beobachtet. Der unspezifisch gebundene Anteil läßt sich vom spezifisch gebundenen Anteil mit den derzeit zur Verfügung stehenden experimentellen Möglichkeiten nur näherungsweise differenzieren (MARINETTI et al. 1974; CUATRECASAS und HOLLENBERG 1976).

Die Analyse der Bindungsdaten hat zur Aufstellung von Bindungsmodellen geführt. Zur Zeit werden zwei Modelle diskutiert.
(1) Es existieren verschiedene Rezeptoren mit verschiedenen Affinitäten zum Hormon (KAHN et al. 1974).
(2) Der Verlauf der hormonkonzentrationsabhängigen Bindung ist negativ kooperativ (DE MEYTS et al. 1973; DE MEYTS und ROTH 1975; DE MEYTS 1976b; DE MEYTS et al. 1976).
D.h. gleiche Rezeptoren können ihre Affinität gegenüber Insulin ändern. Übergänge von einem Affinitätszustand in einen anderen sind denkbar, entweder durch eine ligandeninduzierte Konfigurationsänderung der Tertiär- oder Quartärstruktur oligomerer Rezeptoren (MONOD et al. 1965; KOSHLAND et al. 1966; RUBIN und CHANGEUX 1966), oder durch eine reversible Aggregation respektive Dissoziation von Rezeptoren.
"Cluster" könnten z.B. durch eine ligandeninduzierte Umverteilung der Rezeptoren in der fluiden Plasmamembran zustande kommen (SINGER und NICOLSON 1972; NICOLSON und POSTE 1977). Ebenso könnte eine Konformationsänderung von oligomeren Rezeptoren, ausgelöst durch eine Clusterbildung, kooperative Phänomene bewirken (LEVITZKI 1974).

Gleichzeitig mit der Bindungsreaktion laufen am Insulin Abbauprozesse ab. Diese werden zum Teil von unspezifischen Proteasen verursacht. Zum Teil können sie als eine spezifische Folgereaktion auf den ersten Schritt der Insulinwechselwirkung mit dem Rezeptor diskutiert werden. Aus den Untersuchungen über den Insulinabbau wurden ebenfalls Modelle entwickelt:

(1) Der spezifische Insulinabbau findet zellextern statt ("receptor-transducer-model"). Insulin bindet, dissoziiert und wird abgebaut, ohne in die Zelle aufgenommen worden zu sein. Das Signal wird von einem "second messenger" übertragen. Für dieses Modell sprechen Befunde von GAMMELTOFT et al. (1978) und GLIEMANN und SONNE (1978).

(2) Der spezifische Insulinabbau findet zellintern statt ("receptor-transducer-internalization-model"). Insulin wird via Rezeptorbindung in die Zelle eingeschleust und abgebaut. Es kann selber "messenger"-Funktion übernehmen. Zu dieser Interpretation tendieren TERRIS und STEINER (1975 und 1976), STEINER (1976), BERGERON et al. (1979) und CARPENTIER et al. (1979a, b). Im Zusammenhang mit diesem Modell werden verschiedene Möglichkeiten der Aufnahme von Insulin in die Zelle diskutiert. Die Internalisierung erfolgt entweder über Endocytose, möglicherweise nach Aggregation von Insulin-Rezeptor Komplexen in der fluiden Plasmamembran. GINSBERG et al. (1976) postulieren dagegen eine durch Insulin vermittelte Dissoziation des Rezeptors in seine Untereinheiten, die zur Bildung eines Membrankanals führen könnte (STEINER 1977), durch den Insulin in die Zelle eingeschleust werden kann.

Die hier angeführten Modelle tragen jeweils einer Reihe von Beobachtungen Rechnung, die in sich aber wieder mehrere Möglichkeiten der Interpretation zulassen. Der Grund ist nicht zuletzt darin zu suchen, daß die in eine Analyse eingehenden Daten an biologischen Systemen erhoben worden sind, denen a priori nicht definierbare Parameter inhärent sind. Als Résumé ergibt sich, daß sich die oben diskutierten Modelle nicht beweisen lassen. Solange es nicht gelingt, den Rezeptor funktionsfähig zu isolieren und zu reinigen, ist eine weitergehende Aufklärung des Insulinwirkungsmechanismus an der Zelle oder an isolierten Membranen nur denkbar, wenn das methodische Rüstzeug mit dem Ziel verfeinert wird, unspezifische Nebenreaktionen überschaubarer zu machen. Als Ansatzpunkt sind hier eine über den bisherigen Kenntnisstand hinausreichende Charakterisierung des Tracers und des biologischen Materials zu nennen. In diesem Zusammenhang wird auch der Beitrag der Morphologie erwartet.

Der wichtigste und für Bindungsstudien fast ausschließlich verwendete Tracer ist ^{125}J-Insulin. Die ^{125}Jod-Markierung des Insulins hat zu einem Produkt mit hoher spezifischer Radioaktivität geführt und somit direkte Messungen der Bindung überhaupt erst möglich gemacht. Bis vor kurzem beschränkte sich die Charakterisierung des Tracers auf eine chromatographisch einheitliche Fraktion und eine pauschale Bestimmung der biologischen und immunologischen Aktivität. Erst Analysen von HANSEN et al. (1979) haben gezeigt, daß der Substitutionsort für ^{125}Jod im Insulinmolekül beim Jodierungsvorgang zwar nur beschränkt steuerbar ist, aber für Bindung und biologische Wirkung entscheidend ist. Offensicht-

lich ist nur das am Tyr A 14 jodierte Produkt in seinen Eigenschaften dem nativen Insulin voll vergleichbar. Es ist daher notwendig, sich trotz experimenteller Schwierigkeiten um die Herstellung eines molekular einheitlichen Produktes zu bemühen.

Die Charakterisierung des biologischen Zielsystems ist von gleichrangiger Bedeutung. Da überwiegend isolierte Zellsysteme oder partikuläre Plasmamembranpräparationen für Bindungsstudien eingesetzt werden, stehen die Beurteilung der Integrität und der Homogenität der Systeme im Vordergrund.

Die meisten isolierten Zellsysteme, die für Bindungsstudien eingesetzt werden - z.B. Fettzellen (GAMMELTOFT und GLIEMANN,1973; GLIEMANN et al. 1975; GLIEMANN und SONNE 1978; OLEFSKY und Chang 1979), Leberzellen (FREYCHET et al.1974; OLEFSKY et al.1975; LE CAM et al. 1976; GAMMELTOFT et al. 1978, 1979), Herzmuskelzellen (ECKEL und REINAUER 1979) und Mammazellen (O'KEEFE und CUATRECASAS 1974) - werden durch Dissoziation von Geweben gewonnen.
Bei dem zum Teil enzymatisch, zum Teil mechanisch vorgenommenen Aufschluß eines Gewebes sind Schädigungen zumindest eines Teils der Zellen nicht zu vermeiden. Die Charakterisierung einer isolierten Zellpopulation konzentriert sich daher einmal auf die Beurteilung der Intaktheit der Zellen. Außerdem sind Gewebe grundsätzlich aus verschiedenen Zelltypen aufgebaut. Bei der Präparation von Zellen wird zwar versucht, nur einen Zelltyp anzu reichern, Verunreinigungen sind jedoch die Regel. Die Charakterisierung einer Population erfordert daher auch eine Differenzierung der Zelltypen und eine Bestimmung ihrer relativen Antei-

le. Morphologische Methoden finden hierbei einen generellen Einsatz, sowohl bei der Beurteilung der Strukturerhaltung als auch zur Differenzierung der Zellspezies. Einen spezifischen Beitrag der Morphologie zu Untersuchungen über die Insulin-Rezeptor-Wechselwirkung sehen wir jedoch in der Lokalisation des Rezeptors auf der Zelle.

In Anbetracht der komplexen Reaktionen, einschließlich der unspezifischen Insulinbindung und des Insulinabbaus, ist eine Interpretation morphologischer Daten nur in enger Korrelation mit biochemischen Messungen möglich.
Eine Voraussetzung dafür ist, daß der Tracer nicht nur morphologisch,sondern auch im integralen biochemischen Meßansatz gut meßbar ist und seine Eigenschaften denen des nativen Insulins vergleichbar sind. Es bietet sich daher ein autoradiographischer Rezeptornachweis mit ^{125}J-Insulin als Tracer an. Unter Berücksichtigung der erzielbaren Empfindlichkeit sowie Auflösung sehen wir zunächst Untersuchungen an isolierten,intakten Zellen mit folgender Zielrichtung als vorrangig an:

(1) Es ist zu klären, ob in einer Population von isolierten, intakten Zellen, die morphologisch homogen oder heterogen sein können, alle Zellen Insulin binden,und ob die Bindungskapazität aller insulinbindenden Zellen in der gleichen Größenordnung liegt. Zelltypen,die mit unterschiedlicher Affinität das Hormon binden, beeinflussen je nach ihrer Anteiligkeit in einer Population die Bindungsdaten. Eine Differenzierung ist daher notwendig. Sie kann nur morphologisch erfolgen.

(2) Es soll die Verteilung der unter definierten Bedingungen gebildeten Insulin-Rezeptor Komplexe auf der Zelloberfläche der Einzelzelle dargestellt werden, um zu entscheiden, ob der Rezeptor in spezialisierten Membrandomänen lokalisiert ist oder über die gesamte Zelloberfläche verteilt ist. Gelingt in Abhängigkeit von Empfindlichkeit und Auflösung der Darstellungsmethode eine Differenzierung zwischen Gleichverteilung und Ungleichverteilung auf der Oberfläche einer Einzelzelle, so wäre zu prüfen, ob durch Variation der Versuchsparameter eine Umverteilung der Insulin-Rezeptor Komplexe in der Plasmamembran zu erreichen ist.

(3) Es ist zu prüfen, ob der Tracer oder markierte Abbauprodukte grundsätzlich in die Zelle eingeschleust werden.

Aussagen über die Beweglichkeit der Insulin-Rezeptor Komplexe in der Plasmamembran, und über "Cluster"-Bildung sowie der Nachweis des Labels innerhalb der Zelle können zum Beweis einer der oben diskutierten Modellvorstellungen beitragen.

Mehrere Arbeitsgruppen (GOLDFINE et al. 1977, 1978; BERGERON et al. 1977, 1979; CARPENTIER et al. 1978, 1979a, b) haben sich dem Problem der Internalisierung zugewandt und versuchen, mittels Autoradiographie von Schnittpräparaten die Aufnahme von Insulin in die Zelle zu beweisen (siehe Punkt 3). Wir haben dagegen versucht, eine autoradiographische Darstellungsmethode zu entwikkeln, mit der es möglich ist, Insulin-Rezeptor Komplexe auf Zelloberflächen quantitativ zu bestimmen, um auf diese Weise eine Topographie der Insulinbindung innerhalb einer Zellpopulation sowie eine Topographie der Insulin-Rezeptor Komplexe auf der

Einzelzelle zu ermöglichen (siehe Punkte 1 und 2).

Die hier vorgelegte Arbeit umfaßt eine Beschreibung der Methode und die Darstellung erster damit erzielter Ergebnisse an isolierten Leberzellen und an einer Population von Monozyten und Lymphozyten.

II METHODISCHE BASIS DES AUTORADIOGRAPHISCHEN REZEPTOR NACHWEISES

1. Allgemeine Überlegungen

Das Ziel ist, eine Nachweismethode zu entwickeln, die eine quantitative Bestimmung der markierten Rezeptorstellen auf Zelloberflächen erlaubt und eine Korrelation mit biochemischen Bindungsdaten ermöglicht.

Da die Konzentration der Rezeptoren in der Plasmamembran äußerst gering ist, steht das methodische Problem des Nachweises und damit verbunden die Diskussion der erzielbaren Informationsgehalte im Vordergrund. Daher sind auch, im Hinblick auf die Interpretierbarkeit der morphologischen Ergebnisse, die Bindungseigenschaften des Tracers, die Empfindlichkeit der Nachweismethode und die erzielbare Auflösung als voneinander abhängige Faktoren besonders abzuwägen und zu gewichten.

Tracer

^{125}J-Insulin ist für morphologische Untersuchungen unter den derzeit denkbaren Tracern am besten geeignet:

(1) ^{125}J-Insulin wird ausschließlich für biochemische Untersuchungen eingesetzt. Somit ergibt sich für morphologische Untersuchungen eine optimale Vergleichsmöglichkeit. (Der Ausdruck "biochemisch" soll im folgenden Messungen beschreiben, die in einer Zellpopulation die Insulinbindung integral bestimmen, und als Gegensatz zu "morphologischen" Messungen, die die Insulin-

bindung am Einzelobjekt differenzieren, verstanden werden). Bindungseigenschaften und biologische Wirkung des jodierten Präparates sind mit dem nativen Insulin offenbar vergleichbar (SODOYEZ et al. 1975; GLIEMANN und SONNE 1978; HANSEN et al. 1979).

Der Einsatz von ^{3}H-Insulin ist für autoradiographische Untersuchungen limitiert. Die vergleichsweise höchsten spezifischen Radioaktivitäten wurden mit einem semisynthetischen ^{3}H-Insulin erzielt (HALBAN und OFFORD 1975). Sie betragen jedoch weniger als ein Zehntel ($\sim$ 5 /uCi /ug) der durch Jodierung erzielbaren spezifischen Radioaktivität (> 250/uCi /ug).

Im Gegensatz zu den radioaktivmarkierten Insulinen ist die Verwendung von Insulinen, die mit Makromolekülen als Marker verknüpft sind, grundsätzlich problematisch. Es wurden beispielsweise Peroxidase (BIENER et al. 1973) und Ferritin (JARETT und SMITH 1974, 1977) für elektronenmikroskopische Untersuchungen und rhodaminmarkiertes Lactalbumin (SHECHTER et al. 1978) für fluoreszenzmikroskopische Untersuchungen an Insulin gekoppelt. Abgesehen davon, daß diese Kopplungsprodukte, soweit sie nicht auch noch jodiert wurden, meßtechnisch sehr schwer zu erfassen sind, hat die Verknüpfung von Insulin mit einem Makromolekül eine Veränderung der Bindungseigenschaften und auch der biologischen Aktivität zur Folge. SHECHTER et al. (1978) geben beispielsweise für ihr Produkt eine Abnahme der "Bindungspotenz" um 90 % an. Das Präparat ist praktisch biologisch inaktiv.

(2) Das ^{125}J-Isotop kann autoradiographisch quantitativ nachgewiesen werden. Für ^{125}J sind sehr gute Zählausbeuten (ca. 50 % aller Zerfälle) und die beste Auflösung gemessen worden (FERTUCK und SALPETER 1974; SALPETER et al. 1977, 1978).

(3) Die einfache Messung für feste und flüssige Proben von Gammastrahlern ermöglicht eine kontinuierliche Kontrolle und Bilanz des Tracers während der Präparation.

Nachweisbedingungen

Ausgehend von den physikalischen Eigenschaften des ^{125}J-Isotops und unter Berücksichtigung der Rezeptorkonzentration pro Flächeneinheit ergeben sich für die Geometrie des autoradiographischen Präparats folgende Überlegungen:

Nimmt man beispielsweise eine gleichmäßige Verteilung von Rezeptoren auf der Zelloberfläche an, so lassen sich für eine Reihe von Zelltypen etwa 10 - 100 Rezeptoren pro μm^2 Plasmamembran aus biochemischen Bindungsdaten berechnen (KAHN 1976). Bei physiologischen Hormonkonzentrationen - das ist der Bereich zwischen 10^{-10} und 10^{-9} mol/l (BLACKARD und NELSON 1970)- sind in der Regel weniger als die Hälfte aller Rezeptorstellen mit dem Hormon besetzt. Daraus ergibt sich, daß alle Präparationstechniken, die einen nennenswerten Anteil der Zelloberfläche zur Darstellung bringen, grundsätzlich für den Rezeptornachweis besser geeignet sind als die herkömmlichen Schnitt-Techniken. Das läßt sich auf einfache Weise am Beispiel einer kugelförmigen Zelle mit einem Durchmesser von rund 20 µm abschätzen. In einem 0.15 µm dicken Querschnitt durch die Zellmitte beträgt die Plasmamembran-Fläche

$\sim$ 10 μm^2. Gelingt es dagegen, nur ein Fünftel der Zelloberfläche darzustellen, so stehen 250 μm^2 der Zelloberfläche und somit eine 25 x höhere Rezeptoranzahl für den Nachweis zur Verfügung. Während sich im Schnittpräparat bei einer niedrigen Markierung der Zelle (entsprechend Hormonkonzentrationen von 10^{-10} - 5 x 10^{-10} mol/l) das Signal kaum vom Hintergrundrauschen abhebt (CARPENTIER et al. 1978; GORDEN et al. 1978), ist in einem Oberflächenpräparat unter gleichen Bedingungen ein Signal zu erwarten, das sich deutlich vom Hintergrund abhebt, um die Verteilung der markierten Rezeptorstellen anzuzeigen.

Aus diesem Grund haben wir eine Autoradiographie von Zellausstrich-Präparaten versucht, obwohl dafür eine erhebliche Reduktion der Strukturauflösung im Vergleich zu Schnittpräparaten inkauf genommen werden muß.

Im Folgenden sind die Markierung der Zellen (= Insulinbindung) und die morphologischen Präparationsschritte bis zur Autoradiographie unter "Zytologischen Techniken" zusammengefaßt. Die theoretischen Überlegungen zur Autoradiographie von ganzen Zellen und die autoradiographischen Präparationstechniken sind im Abschnitt "Autoradiographische Techniken" beschrieben.

2. Zytologische Techniken

Alle Präparationsschritte sind im Hinblick auf eine quantitative Auswertung und eine möglichst enge Korrelation mit biochemischen Daten konzipiert worden. In Abbildung 1 ist der Präparationsablauf schematisch dargestellt. Von den einzelnen Präparations-

PRÄPARATIONSSCHEMA

Incubation der Zellsuspension mit ^{125}I-Insulin, analog den biochemischen Bindungsansätzen

↓

Stoppen der Reaktion in Eis

↓

Trennung des freien Insulins über einen zweistufigen Percoll™-Gradienten

↓

Fixierung der Zellfraktionen mit Glutaraldehyd, Bestimmung des gebundenen Insulins pro Zellzahl

↓

3 x waschen in isotonem Puffer bei Raumtemperatur

↓

Suspension des Zellpellets in 0.1% iger BSA-Lösung in Wasser und Präparation der Zellausstriche

↓

Befilmen der Ausstrichpräparate mit einer ca 1500 Å Ilford L 4 Monoschicht auf einem 150 Å Kollodium-Stripping Film

↓

Exposition, Entwicklung in MikrodolX, Fixierung der Autoradiogramme

↓

Auswertung der Autoradiogramme im Lichtmikroskop oder im Raster-Elektronenmikroskop

Abbildung 1

Darstellung der Präparationsschritte zur Herstellung von Autoradiogrammen von Zellausstrichen.

Für eine quantitative Auswertung der Autoradiogramme sind definierte Bindungsparameter, eine irreversible Fixierung des zellgebundenen Insulins und reproduzierbare photographische Bedingungen Voraussetzung.

schritten sollen diejenigen, die für die Interpretation des Endergebnisses von Bedeutung sind, gesondert dargestellt werden.

2.1 Insulinbindung

Für die morphologische Identifizierung des Rezeptors gelten im Prinzip die gleichen Kriterien wie für den biochemischen Nachweis. Unter den gewählten Bedingungen können für die autoradiographischen Untersuchungen, wie bereits erwähnt, Bindungsansätze aus jeder beliebigen biochemischen Meßreihe weiter verwendet werden.

Folgende Bedingungen wurden bei allen hier beschriebenen Versuchen eingehalten:

Die Insulinbindung wurde nach Einstellung des Bindungsgleichgewichts untersucht.
Als Versuchstemperatur wurden 15°C gewählt.
Bei Temperaturen über 30°C wird bei allen Zielgeweben und Zielzellen innerhalb weniger Minuten ein Bindungsgleichgewicht erreicht (z.B. Fettzellen: GAMMELTOFT und GLIEMANN 1973; KAHN und BAIRD 1978; Leberzellen: FREYCHET et al. 1974; GAMMELTOFT et al. 1978; Leberplasmamembranen: SOLL et al. 1975; Lymphozyten: GAVIN et al. 1972, 1973). Gleichzeitig wird bei diesen Temperaturen in Abhängigkeit vom jeweiligen biologischen System eine hohe Abbaurate für Insulin beobachtet (LE CAM et al. 1975; TERRIS und STEINER 1975; VARANDANI et al. 1976). Die Höhe der Abbauraten scheint entscheidend von der Aufbereitung und Handhabung des biologischen Materials abzuhängen (GAMMELTOFT et al. 1978; GLIEMANN

und SONNE 1978) und vermutlich ein Grund für divergierende Bindungsdaten zu sein (GAVIN et al. 1972, 1973).

Zahlreiche Bindungsstudien, vor allem solche, die einen Vergleich von Bindungskapazitäten unterschiedlicher Systeme anstreben, werden daher bei Temperaturen unter 20°C durchgeführt (SOLL et al. 1974; OLEFSKI et al. 1975; SCHWARTZ et al. 1975; DE MEYTS 1976a; BECK-NIELSEN et al. 1977, 1978; BLANCHARD et al. 1978).

Aus dem gleichen Grund haben wir für die autoradiographischen Experimente, die zunächst einen Vergleich der Insulinbindungskapazitäten bei verschiedenen Zelltypen ermöglichen sollen, die Zellmarkierung bei 15°C durchgeführt. Bei dieser Temperatur wird ein "steady state" der Bindung erst nach 1 1/2 - 3 Stunden erreicht, eine Zeitspanne, in der auch die Überlebensrate der Zellen noch nicht signifikant abnimmt.

Die Inkubationen wurden in Eppendorf-Röhrchen (Plastik) in 1.5 ml Ansätzen durchgeführt (detaillierte Inkubationsbedingungen siehe Abschnitt III und IV). Die isolierten Zellen wurden durch langsames Drehen in Suspension gehalten. Grundsätzlich wurden in Parallelansätzen jeweils die "Gesamtbindung" und durch Kompetition mit einem 10^3 - 10^4fachen Überschuß an kaltem Insulin der sogenannte "unspezifische" Bindungsanteil bestimmt. Es wird immer wieder darauf hingewiesen, daß die Differenzierung der spezifischen und unspezifischen Bindung noch nicht adaequat gelöst ist (z.B. MARINETTI et al. 1974; CUATRECASAS und HOLLENBERG 1976). Der Kompetitionsansatz hat sich jedoch als praktikable

Methode zur Abschätzung der unspezifischen Bindung durchgesetzt.

Nach Erreichen des "steady state" wurden die Proben in Eis abgekühlt und sofort auf einen auf 4°C aequilibrierten Gradienten zur Abtrennung des nicht zellgebundenen Insulins übertragen.

2.2 Abtrennung des freien Insulins

Nach Inkubation wird bei biochemischen Bindungsuntersuchungen das nicht zellgebundene Insulin üblicherweise mit Hilfe der Filtertechnik oder der Ölzentrifugationsmethode abgetrennt. Für morphologische Untersuchungen sind beide Trenntechniken nicht geeignet. Im ersten Fall können die Zellen vom Filter nicht mehr abgelöst werden. Im zweiten Fall wird infolge der hochtourigen Zentrifugation durch die Ölschicht ein fest gepacktes Pellet erhalten, das nicht mehr zu einer homogenen Zellsuspension verarbeitet werden kann.

Dagegen hat sich eine Zentrifugation über einen zweistufigen Dichtegradienten als günstig erwiesen.
Als Gradienten-Medium wurde Percoll™ verwendet, das mit NaCl isotonisch gemacht wurde. Die gewünschten Dichten wurden durch Verdünnung mit isotonem Hank-Puffer hergestellt. In Zelluloseni-trat-Röhrchen (Beckman ®, Größe 9/16"Ø 3 3/4") wurden 5 ml einer Percoll™-Lösung geringerer Dichte (ϱ = 1.04 g/ml für Lymphozyten und Monozyten und ϱ = 1.04 g/ml für Hepatozyten) mit 4 ml einer Percoll™-Lösung höherer Dichte (ϱ = 1.07 g/ml für Lymphozyten und Monozyten und ϱ = 1.125 g/ml für Hepatozyten) unterschichtet. Der Gradient wurde auf 4°C aequilibriert. 1.5 ml der Zellsuspen-

sion wurden überschichtet und 3 - 5 Minuten bei 400 x g zentrifugiert. Die Zellen bandeten an der Interphasengrenze zwischen den beiden Percoll^{TM}-Lösungen und wurden durch Austropfen fraktioniert. 1 ml Fraktionen wurden mit 0.5 ml 2.5 %iger Glutaraldehyd-Lösung in isotonem Kakodylat-Puffer fixiert. In den fixierten Fraktionen wurde die Radioaktivität mit einem Gammazähler (Zählausbeute = 70 %) gemessen und die Zellzahl pro Volumen bestimmt.

Da die Zellfraktionen bei der ersten Gammazählung bis zu 50 % des Gradientenmediums enthalten können, sind die Quencheffekte des Mediums zu beachten. Alle metrizamidhaltigen Medien senken infolge des hohen Jodgehaltes (2-(3-Acetamido-5-N-methylacetamido-2,4,6-tri-iodobenzamido)-2-deoxy-D-glucose) die Zählausbeute. Die Korrektur des Quencheffektes ist umständlich, da die Metrizamidkonzentration in den einzelnen Fraktionen schwankt und über die Messung des Brechungsindex jeweils ermittelt werden muß. Percoll^{TM} beeinträchtigt die Zählausbeute nicht und wird deshalb zur Zeit ausschließlich verwendet.

Gradiententrennung und Trennung mit der Filtermethode ergaben innerhalb der Meßfehlerstreuung übereinstimmende Werte. Als Beispiel sind in Tabelle 1 einige Wertepaare von Hepatozyten zum Vergleich gegenüber gestellt.

Tabelle 1

Vergleich der Gesamtbindungswerte nach Abtrennung des freien Insulins über Filter und Dichtegradienten.

^{125}J-Insulin i.Ansatz mol/l	Filtermethode cpm/10^6 Zellen	Gradient cpm/10^6 Zellen
5×10^{-10}	$\bar{x}$ = 29050	$\bar{x}$ = 29600
	n = 4	n = 4
	s = $\pm$2258	s = $\pm$2022
2.5×10^{-10}	$\bar{x}$ = 13580	$\bar{x}$ = 15440
	n = 4	n = 4
	s = $\pm$1590	s = $\pm$1880

2.3 Glutaraldehydfixierung

Nach Beendigung der Inkubation mit Insulin wurden alle weiteren Präparationsschritte bis zur Fixierung bei 4°C durchgeführt. Für Zentrifugation und Fraktionierung wurden ca. 15 - 20 Minuten benötigt. Ausgehend von den in der Literatur beschriebenen Dissoziationsraten (DE MEYTS et al. 1976b), ist bei 4°C innerhalb dieser Zeitspanne die Dissoziation des Insulins vom Rezeptor zu vernachlässigen. Es kann dagegen angenommen werden, daß Glutaraldehyd den Insulin-Rezeptor Komplex in situ vernetzt und eine unspezifische Vernetzung abdissoziierender Insulinmoleküle mit anderen Proteinen der Plasmamembran ohne Bedeutung ist.

Als Maß für die Effektivität der Glutaraldehydfixierung dienten Auswaschversuche bei Raumtemperatur (JUNGER 1978). Je 1 ml Portionen der aus dem Percoll™-Gradienten gewonnenen Zellfraktio-

nen wurden zu 0.5 ml 2.5 %iger Glutaraldehydlösung gegeben. Anschließend wurde die Radioaktivität pro Zellzahl bestimmt. Die Suspension wurde mehrfach gewaschen, indem in Intervallen von 60 min auf 5 ml mit Puffer verdünnt und die Zellen niedertourig sedimentiert wurden. Die Sedimente wurden aus Gründen der Zählgeometrie im Gammazähler zunächst wieder in 1.5 ml Puffer aufgenommen. In diesem Volumen wurde die Radioaktivität pro Zellzahl bestimmt, ehe erneut auf 5 ml verdünnt wurde.

Die Meßgenauigkeit wird in erster Linie durch den Meßfehler der Zellzahlbestimmung beeinflußt, der erfahrungsgemäß~20 % beträgt. Unter Berücksichtigung dieser Fehlerbreite kann anhand der Kurvenverläufe in Abbildung 2 angenommen werden, daß eine quantitative Fixierung des Insulins an den Rezeptor stattgefunden hat. Das heißt, daß die Anzahl der unter definierten Bindungsbedingungen mit dem Tracer besetzten Rezeptoren im autoradiographischen Präparat exponiert werden.

Diese Ergebnisse stellen die Basis für die autoradiographischen Experimente dar. Der gesamte Aufwand einer quantitativen Auswertung der Autoradiogramme wird erst durch die Sicherstellung einer quantitativen Fixierung der Insulinrezeptor-Komplexe gerechtfertigt.

2.4 Herstellung der Zellausstriche

Um von Puffersalzen freie, homogen verteilte Zellausstriche zu erhalten, ist es notwendig, die fixierte Zellsuspension einmal in Wasser zu waschen und das Sediment in 0.1 %iger Albumin-

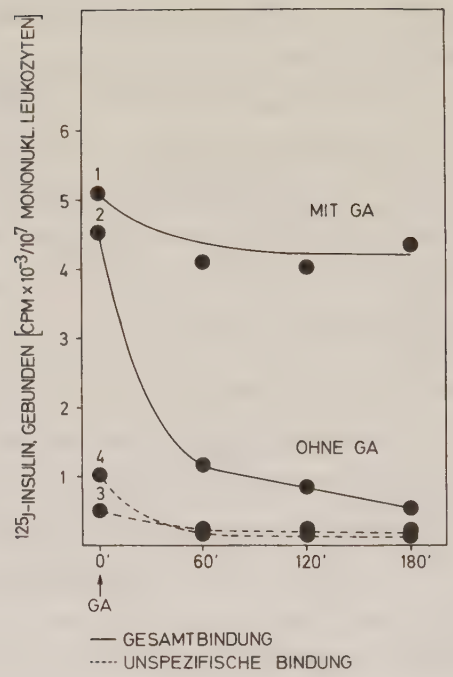


Abbildung 2

Fixierung der Insulin-Rezeptor Komplexe.

Ca. 2 x 10^7 Lymphozyten und Monozyten pro ml wurden mit 5 x 10^{-10} mol/l ^{125}J-Insulin (SA 100 µCi/µg) in einem Hepes-BSA Medium, pH 7.8, 280 mosmol, bei 15°C 120 min inkubiert. Die Abtrennung des freien Insulins erfolgte über einen Percoll™-Gradienten. (1) Zu 1 ml Zellsuspension wurden 0.5 ml 2.5 % Glutaraldehyd (GA) in Kakodylat-Puffer zugegeben. (2) zu 1 ml Zellsuspension wurden 0.5 ml Puffer zugegeben. Parallel dazu wurden zur Bestimmung der unspezifischen Bindung ca. 2 x 10^7 Lymphozyten und Monozyten mit 5 x 10^{-10} mol/l ^{125}J-Insulin und einem 10^4-fachen Überschuß an nativem Insulin unter den gleichen Bedingungen inkubiert. Nach Abtrennung des freien Insulins wurden (3) zu 1 ml Zellsuspension 0.5 ml GA-Lösung und (4) zu 1 ml Zellsuspension 0.5 ml Puffer hinzugefügt. Alle Proben wurden in 60 Minutenabständen mit je 5 ml Puffer gewaschen. Der Verlust an Radioaktivität wurde pro Anzahl Zellen bestimmt. Die Zählwerte wurden auf 10^7 mononukleäre Leukozyten normiert.

Lösung aufzunehmen. Der Zusatz von Albumin garantiert eine ausreichende Benetzung der Glasoberfläche des Objektträgers, so daß im luftgetrockneten Präparat die Zellen homogen verteilt sind. Nach Antrocknen haften die Zellen, so daß restliche Salze und Albumin ausgewaschen werden können.

3. Autoradiographische Techniken

3.1 Radioaktiver Zerfall von ^{125}J

^{125}J zerfällt mit einer Halbwertszeit von 60 Tagen. Bei dem Zerfall werden eine weiche Gammastrahlung und verschiedene Konversions- und Augerelektronen von zwei unterschiedlichen Energiebereichen emittiert: 3 - 4 keV Elektronen (80 %) und 23 - 24 keV Elektronen (20 %). Diesen Energien entsprechen in einem Medium der Dichte ϱ = 1 g/ml mittlerenReichweiten von 200 nm und 15 µm (ATKINS 1969; FERTUCK und SALPETER 1974).

3.2 Präparatgeometrie

Aufgrund der spektralen Verteilung der ^{125}J-Elektronen und ihrer Reichweite ist die Geometrie des autoradiographischen Präparates für die erzielbare Information entscheidend.

FERTUCK und SALPETER (1974) haben gezeigt, daß bei dünnen Objekten (20 nm - 200 nm Schnitte) und bei dünnen Photoschichten (150 nm) fast ausschließlich die niederenergetischen Elektronen das Signal verursachen. Die Autoren schätzen für 3 - 4 keV Elektronen in Kunstharz (elektronenmikroskopische Einbettungsmittel)

eine Reichweite von ~ 200 nm. Der Beitrag der 23 - 34 keV Elektronen ist bei dieser Probengeometrie unbedeutend. Gammastrahlen werden nicht registriert. Je nach Anordnung der Strahlquellen im Objekt, können die 23-34 keV Elektronen mit einer mittleren Reichweite von ~15 µm bei Verwendung von dicken Objekten und dicken Emulsionschichten einen bedeutenden Beitrag zum Signal leisten. (ERTL et al.1970; ADA et al. 1966). Die Detektion von Gammastrahlen ist dagegen auch bei diesen Präparaten mangels Empfindlichkeit der Photoschicht unwahrscheinlich (ROGERS 1967).

Für den autoradiographischen Nachweis des Insulinrezeptors sollen, um einen möglichst großen Teil der Zelloberfläche darzustellen, Zellausstrichpräparate verwendet werden. Das Objekt, die ganze Zelle, kann näherungsweise als Kugel betrachtet werden, mit einem Durchmesser von der Größenordnung 10 - 20 µm. Die Photoschicht ist aus präparationstechnischen Gründen (siehe S 27-28) nur mit der Zellkuppe in gutem Kontakt (Abbildung 3), so daß nur dieser Präparatbereich (schraffierte Fläche in Abbildung 3) für eine Analyse verwendbar ist.

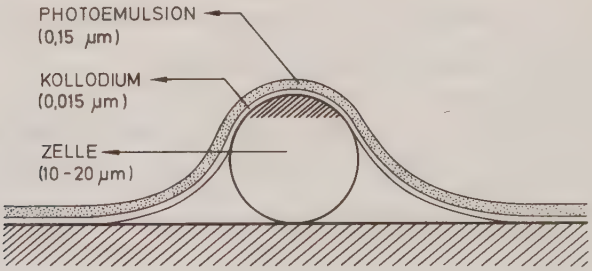


Abbildung 3
Präparatgeometrie

Bei dieser "Objekt:Strahlenquellen:Detektor - Geometrie" können sowohl die 3 - 4 keV Elektronen als auch auch die 23 - 34 keV Elektronen zum Signal beitragen. Die Strahlungen werden jedoch voraussichtlich mit unterschiedlichen Empfindlichkeiten registriert werden. Infolge ihrer sehr geringen Reichweite (200 nm) können die 3 - 4 keV Elektronen nur von dem der Photoschicht direkt anliegenden Präparatabschnitt (= die der Photoschicht zugewandte Zelloberfläche) die Photoschicht erreichen. Sie werden mit hoher Empfindlichkeit registriert (FERTUCK und SALPETER 1974). Das Signal, das von diesen Elektronen verursacht wird, beinhaltet die gewünschte Ortsinformation. Die höherenergetischen Elektronen können von allen Teilen der Zelle die Photoschicht erreichen und ein Bild produzieren. Elektronen dieses Energiebereiches werden jedoch mit wesentlich geringerer Empfindlichkeit registriert (BACHMANN und SALPETER 1967; FERTUCK und SALPETER 1974). Die meisten dieser Elektronen übertragen in Bezug auf den Rezptor-Ort keine Information, sondern tragen zum allgemeinen Hintergrundsrauschen bei. Um die Nachweisempfindlichkeit für diese Elektronen so weit als möglich herabzusetzen, wurde eine dünne Photoschicht (Ilford L4 -Emulsion, Schichtdicke 150 nm) verwendet.

Zur Beurteilung des Informationsgehalts der Autoradiogramme, denen die eben beschriebenen Proben-Geometrie zugrunde liegt, ist es notwendig, den Anteil der verschiedenen Elektronen am Signal zu bestimmen. Dazu wurden folgende Testpräparate analysiert:

Im Vergleich zur eigentlichen Proben-Geometrie (15 nm Kollodium, 150 nm Ilford L4), wurde eine Serie von Zellausstrichen mit einem 500 nm dicken Kollodium-Film überzogen, bevor die Photoschicht

(150 nm) aufgetragen wurde. Diese 500 nm dicke Zwischenschicht blockt den Anteil der 3 - 4 keV Elektronen ab. Es wird nur das Signal der 23 - 34 keV Elektronen und der Gammastrahlung registriert. In einer zweiten Serie von Zellausstrichen wurde eine Zwischenschicht von 16 µm verwendet. Als Zwischenschicht wurden die Gelatine-Trägerschichten von fixierten und gewässerten AR 10 Stripping-Filmen verwendet. Die Schichtdicke der luftgetrockneten Gelatine-Schicht beträgt - interferometrisch gemessen - 8 µm. Es wurden Doppelschichten verwendet. Damit wurde der gesamte Anteil der ß-Strahlung abgeblockt, so daß der Anteil der Gammastrahlung abgeschätzt werden konnte. Das Ergebnis ist in Tabelle 2 zusammengefaßt.

Tabelle 2

Analyse des Signals der Autoradiogramme von Zellausstrichen.

Zelltyp	3 - 4 keV Elektronen	23 - 34 keV Elektronen	Gamma-strahlung
Hepatozyten Ø ~ 20 µm	85 %	15 %	0
Lymphozyten/ Monozyten Ø ~ 10 µm	80 %	20 %	0

Die Zellen wurden bei 15°C mit ^{125}J-Insulin markiert. Eine Internalisierung des Labels wurde nicht nachgewiesen

3.3 Beschichtung der Präparate mit Emulsion

Um dichtgepackte, gleichmäßige Silberhalogenid-Kristall-Monoschichten zu erhalten, sind verschiedene Methoden zum Aufbringen der Emulsion beschrieben. Mit der Drahtschlaufenmethode wird eine vorgelierte Emulsion auf das Objekt aufgebracht (CARO und VON TUBERGEN 1962). Flüssige Emulsionen werden entweder durch Eintauchen oder, wenn wenig Emulsion zur Verfügung steht, durch Auftropfen auf den Objektträger aufgebracht (LIQUIER-MILWARD,1956; REVEL und HAY 1963; PELC et al. 1961; SALPETER und BACHMANN 1964; KOPRIVA 1966).

Keine dieser Applikationsmethoden führte zu einer gleichmäßigen Schichtverteilung über den Zellen, wie eindeutig mit rasterelektronenmikroskopischen Methoden gezeigt werden konnte. Selbst eine bereits vorgelierte Emulsion haftet nicht vollständig auf der Zelloberfläche. Bei kleinen Zellen, wie beispielsweise Lymphozyten, ist die Schichtverteilung auf der Zellkuppe inhomogen (Abbildung 4a). Bei großen Zellen, wie Hepatozyten, bleibt auf der Zellkuppe fast keine Emulsion haften (Abbildung 4b-c). Erst mit Hilfe einer Stripping-Film-Technik* (Abbildung 5) konnten dichtgepackte Silberhalogenid-Schichten über den Zellen erhalten werden.

Es sind zwar Methoden zur Herstellung von Stripping-Filmen für die Elektronenmikroskopie beschrieben (z.B. WILLIAMSON und BOSCH

---

* Käufliche Stripping-Filme können für diese Untersuchungen nicht verwendet werden, da die Schichtdicke der Emulsion etwa 5 µm beträgt und somit eine höhere Nachweisempfindlichkeit für 23 - 34 keV Elektronen gegeben wäre.

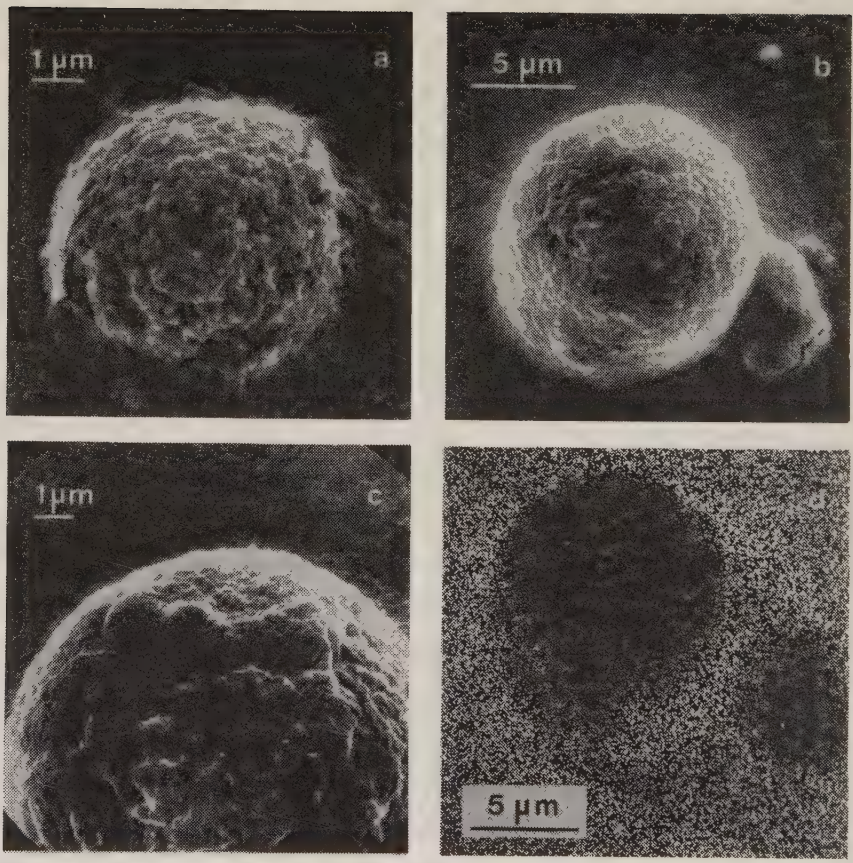
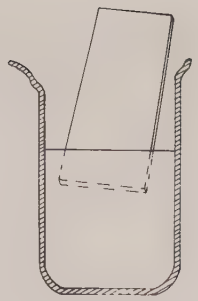


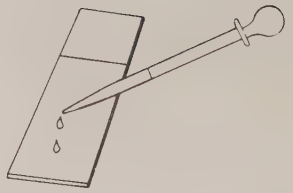
Abbildung 4

Beschichtung der Zellen mit der Drahtschlaufenmethode.

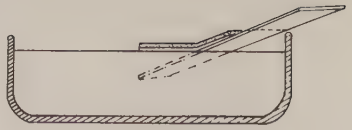
Die Emulsionsschichten wurden im Raster-Elektronenmikroskop beurteilt. Die Präparate wurden mit Gold besputtert.
(Abbildungen 4a-c: mit Sekundärelektronen, Kippwinkel 30°, Strahlspannung 15 kV; 4d: Ag L_α-Verteilung, Kippwinkel 30°, 25 kV).
Die Emulsion benetzt die Zellen nur ungenügend.
4a: Lymphozyt. Die Silberhalogenid-Kristalle bilden keine dichtgepackte Monoschicht. 4b: Hepatozyt. Auf der Zellkuppe bleiben nur einzelne Silberhalogenid-Kristalle haften. 4c: Ausschnitt der Zellkuppe bei höherer Vergrößerung. 4d: Das Elementverteilungsbild von der gleichen Zelle zeigt deutlich die inhomogene Schichtverteilung.



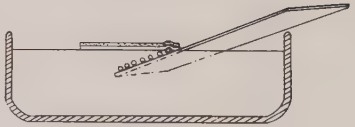
0,15% KOLLODIUM
IN BUTYLACETAT



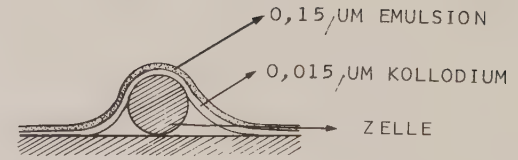
AUFTROPFEN DER
EMULSION



ABFLOTTIEREN DES
STRIPPING-FILMS
AUF WASSER



BEFILMEN DES
ZELLAUSSTRICHS



PRÄPARATGEOMETRIE

Abbildung 5

Herstellung und Aufbringen des Stripping-Films auf Zellausstrichpräparate.
Die Schichtdicken wurden interferometrisch bestimmt.

1971; FISHER und BRANTON 1976; LAND et al. 1977). Für die hier verwendeten Zellausstrich-Präparate hat sich aber folgende Modifikation als geeignet erwiesen (Abbildung 5).

Glasobjektträger wurden mit einem 15 nm dicken Kollodium-Film durch Eintauchen in eine ~0.15 %ige Kollodium-Lösung in Butylacetat befilmt. Die Schichtdicke wurde interferometrisch bestimmt. Über dem Kollodium-Film wurde Ilford L4 Emulsion entweder mit der Drahtschlaufenmethode (CARO und VAN TUBERGEN 1962) oder durch Auftropfen (SALPETER und BACHMANN 1964) beschichtet. Für die Drahtschlaufenmethode wurde die Emulsion 1:2,5 mit Wasser verdünnt, bei 45°C geschmolzen und bei 30 - 32°C äquilibriert. Die Endverdünnung wurde so eingestellt, daß bei Verwendung einer Kupferdrahtschlaufe mit 4 cm Durchmesser nach 30 sec Vorgelieren ein 1 - 2 cm breiter Purpurbereich erzielt wurde. Wenn die Emulsion aufgetropft wurde, wurde sie 1:6 mit Wasser verdünnt, ebenfalls bei 45°C geschmolzen und bei 32°C äquilibriert. Die Endverdünnung wurde ebenfalls empirisch so eingestellt, daß die aufgetragene Schicht im reflektierten Licht eine Purpurfarbe (= 150 nm Ilford L 4 Schicht) aufwies.

Der mit der Emulsion beschichtete Kollodium-Film wurde auf eine Wasseroberfläche abflottiert und durch Eintauchen des Zellausstrichspräparates von unten her gefischt. Auf diese Weise legt sich der Stripping-Film am glattesten über die Zellen. Diese Handgriffe müssen bei Dunkelkammer-Beleuchtung durchgeführt werden. Der abflottierte Film ist jedoch auch bei reflektiertem Rotlicht gut sichtbar.

Die mit der Drahtschlaufenmethode hergestellten Stripping-Filme ließen sich relativ leicht abflottieren. Die Schichtdicke verlief jedoch ausgeprägt keilförmig, wie sich anhand des Interferenzfarbenverlaufs leicht feststellen ließ. Die durch Auftropfen hergestellten Schichten zeigen einen sehr ausgedehnten Purpurbereich, sie ließen sich jedoch schwer abflottieren. Wir ziehen trotz schwierigerer Manipulierbarkeit die aufgetropften Schichten vor, da bei diesen Schichten der Emulsionshintergrund, unserer Beobachtung nach, jeweils um den Faktor 2 - 4 geringer war.

Die letztlich verwendete Präparat-Geometrie ist in Abbildung 3 dargestellt. Die Zelle wird von einem 15 nm dicken Kollodium-Film, der gleichzeitig als inerte Zwischenschicht dient, bedeckt. Darüber befindet sich die Emulsionsschicht, etwa 150 nm dick. Wie aus der Arbeit von FERTUCK und SALPETER (1974) hervorgeht, weisen die niederenergetischen Elektronen eine hohe Selbstabsorption auf. Jede Zwischenschicht führt daher zur Verminderung der Zählausbeute. Anhand der von FERTUCK und SALPETER (1974) angegebenen Meßwerte würde in unserem Falle der Verlust etwa 10 % betragen. Dieser Verlust kann jedoch inkauf genommen werden, wenn dagegen ebenfalls eine Voraussetzung für eine quantitative Autoradiographie - eine homogene Verteilung der Silberhalogenid-Kristalle über dem Objekt zu erreichen ist. Eine Kontrolle im Raster-Elektronenmikroskop zeigte, daß die Silberhalogenid-Kristalle lückenlos angeordnet sind und der Stripping-Film in Kontakt mit der Zellkuppe ist. Diese dichte Packung der Kristalle bleibt auch dann erhalten, wenn die Präparate in wässrige Lösungen eingetaucht werden (Abbildung 6a-d).

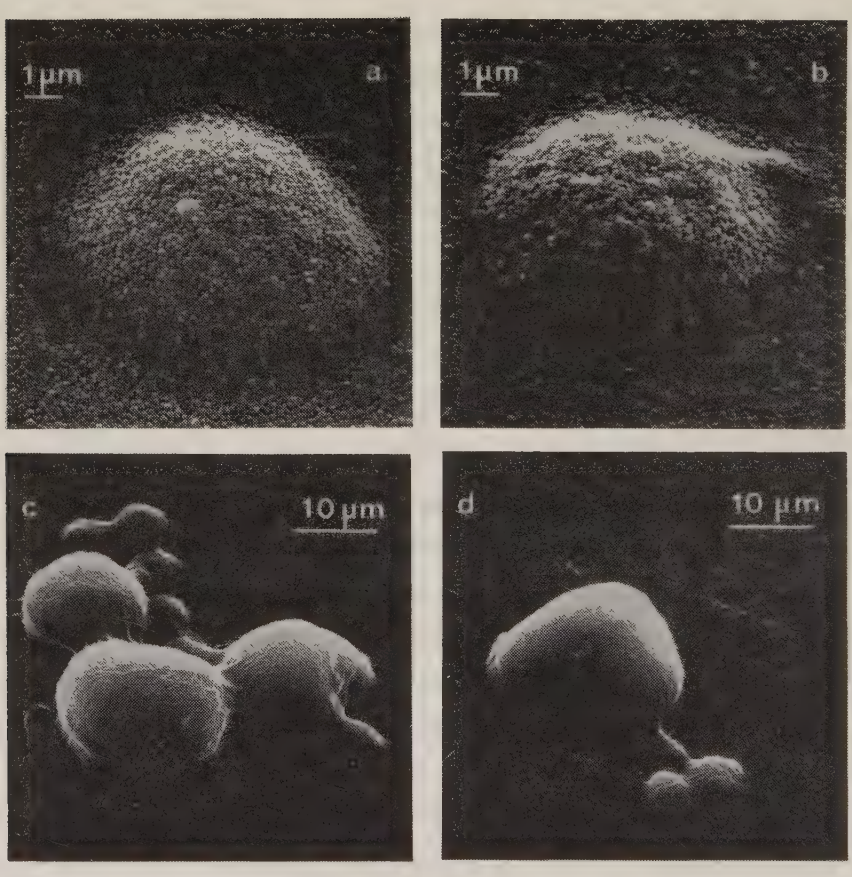


Abbildung 6

Beschichtung der Zellen mit dem Stripping-Film (15 nm Kollodium und 150 nm Ilford L4).

Zu Testzwecken wurden Hepatozyten (Ø 20 µm) und Lymphozyten (Ø 10 µm) gemischt und auf Objektträgern ausgestrichen. Die Präparate wurden nach der in Abbildung 5 dargestellten Methode befilmt. Die Beschichtung wurde im Raster-Elektronenmikroskop an mit Gold besputterten Präparaten kontrolliert. Abbildungen mit Sekundärelektronen, Kippwinkel 30°, Strahlspannung 30 kV (Aufnahmen Dr. Klingele München).
6a: Dichte Packung von Silberhalogenid-Kristallen über einem Lymphozyt. 6b: Nach Eintauchen in Wasser bleibt die Dichtestpackung der Silberhalogenid-Kristalle erhalten. 6c und d: Beschichtete Präparate, in Natriumthiosulfat fixiert, gewässert und an Luft getrocknet. 6c: Die Photoschicht ist sowohl mit

den großen Hepatozyten als auch mit den kleinen Lymphozyten in gutem Kontakt. 6d: Bei großen Zellen reißt die Schicht bisweilen an der Auflagefläche, über der Zellkuppe sind jedoch nie Risse zu beobachten. Bei kleinen Zellen werden auch keine Risse an der Auflagefläche beobachtet.

3.4 Exposition und Weiterverarbeitung der Präparate

Die Expositionszeiten wurden aus den Bindungswerten geschätzt. Die Präparate wurden bei 4°C gelagert und anschließend in Mikrodol X bei 22°C entwickelt. Die Entwicklungszeiten richteten sich nach den weiteren Untersuchungsbedingungen und variierten zwischen 3 Minuten (relativ kleine Silberkörner) und 7 Minuten (große Silberkörner). Die Entwicklung wurde jeweils in 3 %iger Essigsäure gestoppt und anschließend in einer Lösung von 20 % Natriumthiosulfat und 2.5 % Natriumbisulfit fixiert. Nach ausreichender Wässerung wurden die Präparate an Luft getrocknet.

3.5 Analyse der Autoradiogramme

Die fertigen Autoradiogramme können sowohl im Lichtmikroskop als auch im Raster-Elektronenmikroskop ausgewertet werden. Die Identifizierung einzelner Silberkörner ist im Lichtmikroskop nur unter Verwendung von Ölimmersion bei maximaler Vergrößerung (Objektiv: 100 x) möglich. Das erfordert,daß die Präparate eingebettet werden müssen. Für die Analyse im Raster-Elektronenmikroskop befindet sich dagegen die Probe im Vakuum. Es ist von vornherein schwierig, diese beiden, drastisch unterschiedlichen experimentellen Bedingungen zu vergleichen. Trotzdem soll auf halbquantitativer Basis ein Vergleich der beiden Abbildungstechniken versucht werden.

Lichtmikroskopie

Generell eignen sich Einschlußmittel mit höheren Brechungsindices >1.4, die durch Verminderung der Lichtbrechung an den Zellkonturen den Kontrast der Zelle vermindern und das einzelne Silberkorn im Absorptionskontrakt relativ deutlicher hervortreten lassen. Für den Vergleich "Lichtmikroskopie : Raster-Elektronenmikroskopie" wurden mit Wasser mischbare Medien, die sich einfach wieder auswaschen ließen, verwendet. Für routinemäßige lichtmikroskopische Auswertungen der Autoradiogramme wurden mit Wasser nicht mischbare, aushärtende Medien, wie Gurr's Neutral Mounting Medium, verwendet.

Es ist darauf hinzuweisen, daß durch die Glutaraldehydfixierung die Semipermeabilität der Plasmamembran verloren geht, daß aber die Zellen eine gewisse Quellfähigkeit behalten. Das Trocknen der Zellen an Luft bewirkt ein Schrumpfen des Zellvolumens um etwa 50 - 60 %. In Wasser quellen dagegen die Zellen auf ein Volumen, das etwa 30 % über dem nativen Zellvolumen liegt. In salzhaltigen Medien erreichen die Zellen annähernd ihr natives Volumen (Tabelle 3). In Medien, die nicht mit Wasser mischbar sind, bleibt die Größe der luftgetrockneten Zelle erhalten. Diese Volumenänderungen sind beim Vergleich der beiden Abbildungstechniken, nämlich Lichtmikroskopie und Raster-Elektronenmikroskopie, zu bedenken, die grundsätzlich die Zelle in unterschiedlicher Umgebung betrachten (siehe oben).

Im Lichtmikroskop ist die Identifizierung der einzelnen Silberkörner grundsätzlich schwieriger als bei Anwendung elektronenmikroskopischer Methoden. Als günstig hat sich die Abbildung im

Tabelle 3

Mittlere Durchmesser der Glutaraldehyd-fixierten Zellen in verschiedenen Einschlußmedien.

Mittlerer Durchmesser in	Lymphozyten/Monozyten µm	Hepatozyten µm
Isotone Kochsalzlösung	6.61 ± 0.51	22.97 ± 1.31
Lymphoprep^{R}	6.76 ± 0.54	23.10 ± 1.51
Wasser	7.56 ± 0.72	25.16 ± 2.59
Gurr's mounting medium	4.89 ± 0.49	17.27 ± 1.08
luftgetrocknet	4.90 ± 0.47	17.56 ± 1.08

n = 100

Luftgetrocknete Zellausstrichpräparate von Glutaraldehyd-fixierten Zellen wurden in verschiedenen Medien eingeschlossen. Die Änderung der Durchmesser und die damit abschätzbare Änderung der Zellvolumina stimmen mit ähnlichen Untersuchungen von PENTTILA et al. (1974) gut überein.

Mischlicht - Auflicht plus Durchlicht, Hellfeld-Modus - erwiesen.

Die geringe Schärfentiefe des Lichtmikroskops hat zur Folge, daß für die Abbildung einer Zellkuppe mehrere Fokusebenen eingestellt werden müssen (Abbildung 7a). In der Regel waren drei Abbildungen in je 1 µm Fokusstufen erforderlich. Der allgemeine Emulsionshintergrund wurde in einer 4. Abbildung im zellfreien Gebiet registriert (Abbildung 7b-e). Zur Bestimmung der Zahl der Silberkörner wurden diese von den einzelnen Aufnahmen einer Fokusserie auf Transparentpapier übertragen und superponiert (Abbildung 7f). Die Projektionsfläche wurde bestimmt. Die Zählwerte wurden auf eine Einheitsfläche normiert (100 μm^2 für Hepatozyten, 40 μm^2 für Monozyten). Ausgehend von einer annähernden Kugelgeometrie kann aus der Projektionsfläche die aktuell registrierte Zelloberfläche berechnet werden.

Raster-Elektronenmikroskopie

Um eine leitende Schicht zu schaffen, wurden die fertigen Autoradiogramme mit Kohle bedampft. Einige wenige Präparate wurden mit Gold besputtert. In mit Kohle bedampften Präparaten waren die entwickelten Silberkörner sowohl im Sekundärelektronenbild als auch im Rückstreuelektronenbild als Punkte höchsten Kontrastes leicht erkennbar (Abbildung 8a und b). Mit Hilfe der Röntgenanalyse konnte der Beweis erbracht werden, daß jedes Korn, das aufgrund seines Kontrastes als Silberkorn identifiziert wurde, tatsächlich Silber war (Abbildung 8c).

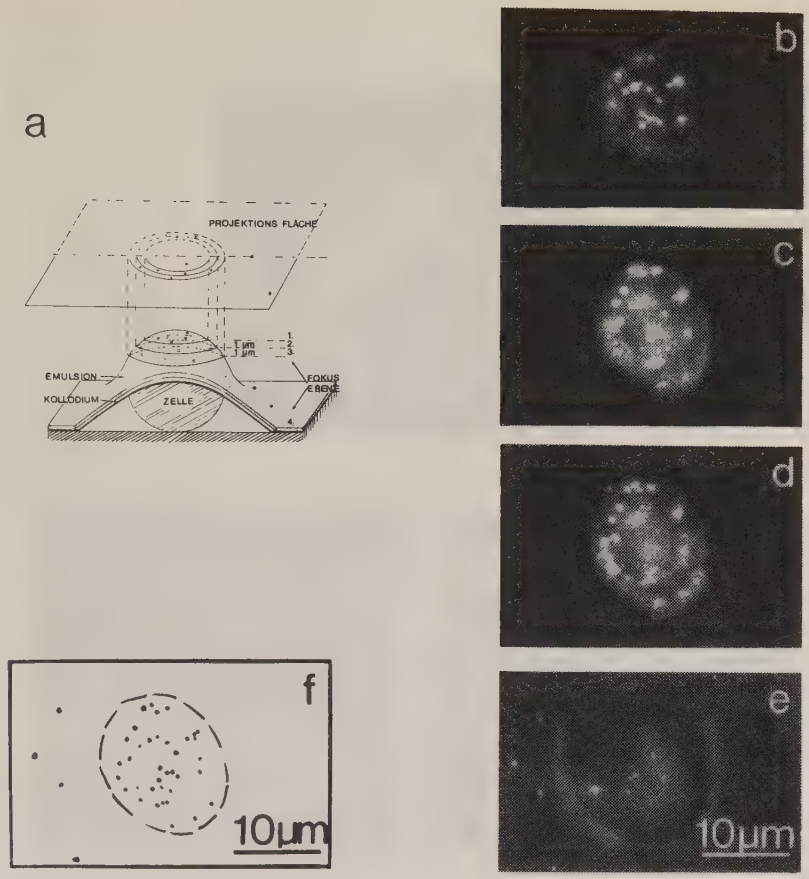
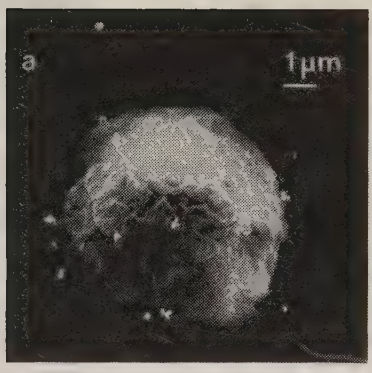
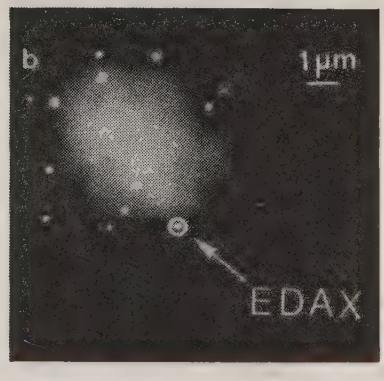


Abbildung 7

Analyse der Autoradiogramme im Lichtmikroskop.

7a: Schematische Darstellung der Probe. Der Stripping-Film ist nur mit der Zellkuppe in gutem Kontakt. Dieser Teil der Zelle wird in aufeinanderfolgenden Fokusebenen registriert. 7b-d: Von der obersten Spitze der Zelle beginnend, werden in je 1 µm Stufen-Fokusdifferenz drei Aufnahmen hergestellt (1.,2. und 3. Fokusebene). 7e: Zur Bestimmung des Hintergrundes wurde von der Objektträgeroberfläche direkt neben der Zelle eine vierte Aufnahme verwendet (4. Fokusebene). 7f: Die Silberkörner der einzelnen Aufnahmen wurden auf Transparentfolien durchgepaust und superponiert. Abbildung Durchlicht plus Auflicht, Hellfeld.





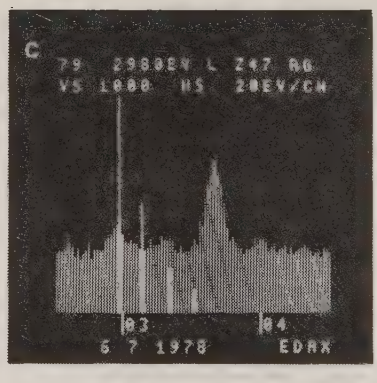


Abbildung 8

Nachweis von entwickelten Silberkörnern im Raster-Elektronenmikroskop.

Die Präparate wurden mit Kohle bedampft. Kippwinkel 0^{o}, Strahlspannung 15 kV.
8a: Abbildung mit Sekundärelektronen. 8b: Rückstreuelektronenbild. Der Silbernachweis mittels Röntgenanalyse war für alle Körner, die aufgrund ihres Kontrastes als Silber identifiziert worden waren , positiv. 8c: Energiedispersive Röntgenanalyse des in Abbildung 8b angezeichneten Silberkornes.

In Gold besputterten Präparaten war dagegen im Z-Kontrast die Identifizierung der Silberkörner eingeschränkt. Es mußte die Elementanalyse zu Hilfe genommen werden.

Um die Silberkornverteilung an ein und derselben Zelle im Lichtmikroskop und im Raster-Elektronenmikroskop vergleichen zu können, wurden Zellgruppen zunächst mit einem Objektmarkierer gekennzeichnet (Abbildung 9). Die kreisförmige Ritzspur konnte im Raster-Elektronenmikroskop leicht wieder aufgefunden werden. Um den Einfluß durch Strahlschäden und Kontamination auszuschließen, wurden markierte Zellen zuerst im Lichtmikroskop abgebildet. Dazu wurden die Präparate in Lymphoprep^{R} eingeschlossen. Anschließend wurde das Einschlußmittel ausgewaschen, das Präparat an Luft getrocknet und im Raster-Elektronenmikroskop erneut photographiert.

Die Superposition der lichtmikroskopischen und der raster-elektronenmikroskopischen Aufnahmen ergab, daß alle Silberkörner des Emulsionshintergrundes, die am glatten Objektträgeruntergrund registriert wurden, deckungsgleich sind (Abbildung 10 h) Die Anzahl der Silberkörner, die auf der Zellkuppe registriert wurde, war mit beiden Abbildungsmethoden gleich. Die Position der Silberkörner war unterschiedlich als Folge der unterschiedlichen Zellvolumina (Tabelle 3). Trotzdem konnten die Silberkörner der lichtmikroskopischen Aufnahmen mit denen der rasterelektronenmikroskopischen Aufnahme aufgrund ihrer relativen Abstände untereinander korreliert werden. Silberkörner, die in äquatorialen Zellteilen lokalisiert waren, konnten nicht mehr korreliert werden (Abbildung 10).

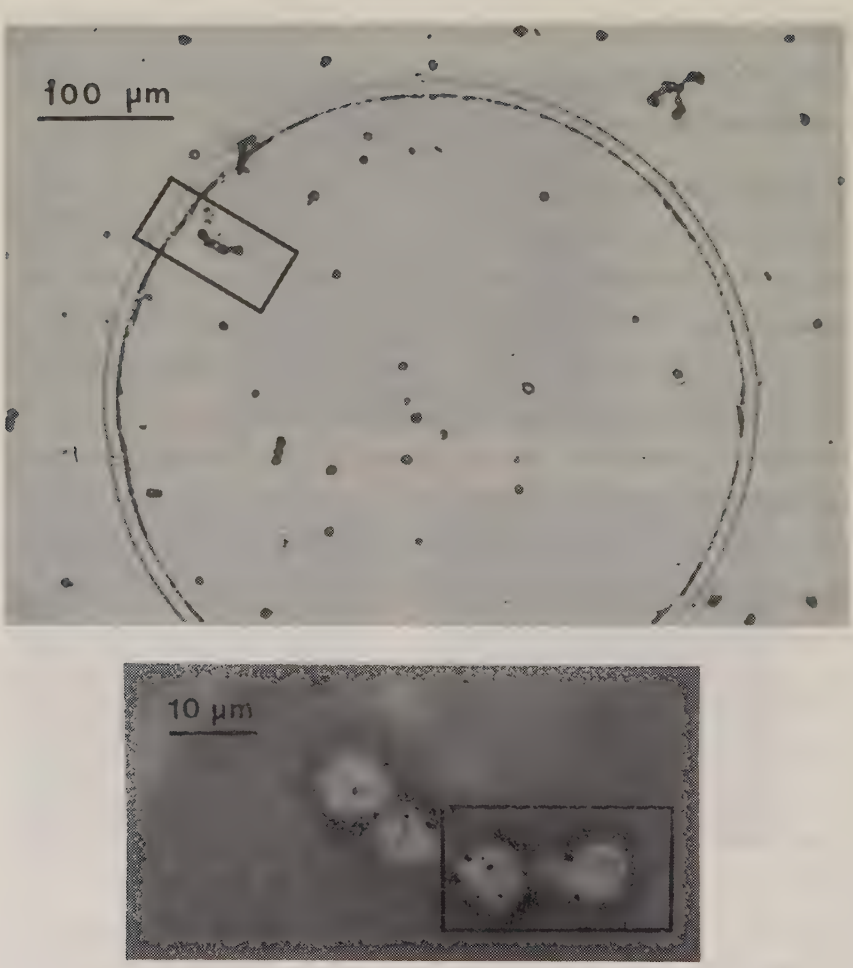


Abbildung 9

Markierung einer Zellgruppe mittels eines Objektmarkierers durch Einritzen eines Kreises von ca. 0.5 mm Durchmesser. Der eingezeichnete Ausschnitt wurde erst im Lichtmikroskop (Durchlicht, Ölimmersion 100 x) und dann im Raster-Elektronenmikroskop photographiert. Siehe Abbildung 10.

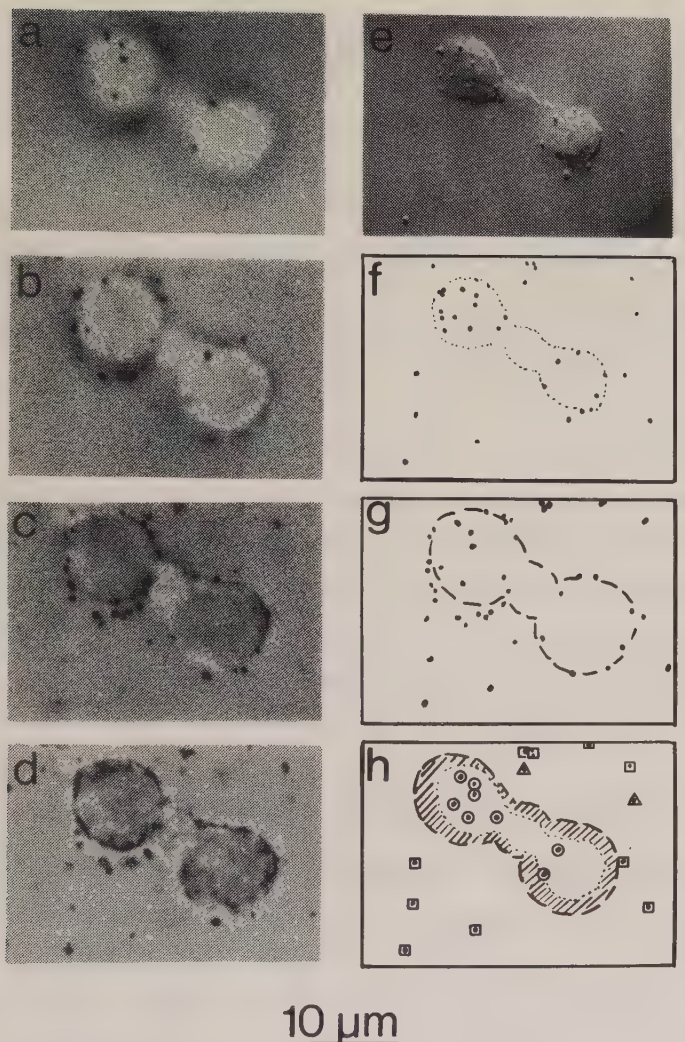


Abbildung 10

Vergleich der Silberkornverteilung im Lichtmikroskop und im Raster-Elektronenmikroskop.

Das Präparat wurde mit Lymphoprep^{R} als Kontaktmittel zuerst im Lichtmikroskop photographiert. 10a-d: Serie von Mikrophotographien in aufeinanderfolgenden Fokusebenen, $\Delta z = 1\,\mu m$. Lymphoprep^{R} wurde ausgewaschen. Anschließend wurden die gleichen Zellen im Raster-Elektronenmikroskop photographiert.

10e:Rückstreu-Elektronenbild, differenziertes Signal, Kippwinkel 0^{o}, Strahlspannung 30 kV.
10f:Projektion der Silberkornverteilung im Rückstreu-Elektronenbild.
10g:Superpositionsmuster der Silberkörner von den lichtmikroskopischen Aufnahmen 4a-d.
10h:Vergleich von Lichtmikroskopie und Elektronenmikroskopie. ◙ Silberkörner des Emulsionshintergrundes sind im Lichtmikroskop und im Raster-Elektronenmikroskop deckungsgleich. ⊙ Silberkörner, die auf der Zellkuppe lokalisiert sind, können aufgrund ihrer relativen Positionen korreliert werden. Silberkörner, die in der Zellperipherie lokalisiert sind, (schraffierte Fläche) lassen sich nicht mehr zuordnen. ▲ Silberkörner im Raster-Elektronenmikroskop gut zu erkennen, im Lichtmikroskop mit sehr schwachem Kontrast abgebildet.

Es wurden auch Zellen zuerst im Raster-Elektronenmikroskop und anschließend im Lichtmikroskop abgebildet. Strahlenschaden und Kontamination beeinträchtigen jedoch die nachfolgende lichtmikroskopische Abbildung. Eine Re-Identifizierung der Silberkörner war nur zu etwa 50 % möglich. Soweit jedoch Silberkörner im Lichtmikroskop re-identifiziert werden konnten, war ihre Position deckungsgleich.

3.6 Autoradiogramme von Semidünnschnitten

Es kann prinzipiell nur mit Schnittpräparaten abgeklärt werden, ob ein Teil des Tracers in die Zelle aufgenommen wurde. Ausgehend von der pro Zelle gebundenen ^{125}J-Insulinmenge läßt sich von vornherein abschätzen, daß nur sehr hohe Internalisierungsraten nachgewiesen werden können. Andererseits ist bei der von uns gewählten Versuchstemperatur von 15^{o}C keine nennenswerte Inkorporation des Tracers ins Zytoplasma zu erwarten. Zur Kontrolle haben wir trotzdem parallel zu den Autoradiogrammen von Zellausstrichen Autoradiogramme von Semidünnschnitten lichtmikroskopisch analysiert

Dazu wurde jeweils ein Teil der mit Glutaraldehyd fixierten Zellen in einer Kakodylat-gepufferten 2%igen OsO_4-Lösung (pH 7.4, 300 mosmol) nachfixiert, über eine Alkoholreihe entwässert und in Epon 812 eingebettet. Von dem eingebetteten Material wurden 0.5 µm dicke Schnitte, und im Falle der großen Hepatozyten auch noch 5 um dicke Schnitte, hergestellt. Als inerte Zwischenschicht wurde eine 50 Å dicke Kohleschicht aufgedampft. Anschließend wurden die Präparate mit einer Ilford L4 Monoschicht (Interferenzfarbe Purpur) befilmt. Nach Expositionszeit von 40-60 Tagen wurden die Präparate in Mikrodol X entwickelt.

Es wurden nur zentrale Zellquerschnitte mit angeschnittenem Zellkern im Lichtmikroskop ausgewertet. Zellanschnitte wurden in die Auswertung nicht mit einbezogen. Silberkörner, die direkt auf der Plasmamembran lokalisiert waren, oder bei 5 µm Schnitten nicht mehr als ± 1 µm von der Plasmamembran entfernt waren, wurden als Markierung der Zelloberfläche gewertet. Der Emulsionshintergrund wurde in zellfreien Eponarealen bestimmt.

3.7 Berechnung der Anzahl der Insulin-Rezeptor Komplexe aus der Silberkorndichte

Die Anzahl gebundener Insulinmoleküle pro Flächeneinheit errechnet sich unter Einbeziehung der ^{125}J-Zerfallcharakteristik nach folgender Formel:

$$D_o = \frac{SK \times d}{\frac{1440 \times t^{1/2}}{\ln 2} [1-e^{-\ln 2\ t\ /\ t^{1/2}}]} \qquad (1)$$

$$M = \frac{D_o \times N}{SA\ ^{125}J\text{-Insulin}} \qquad (2)$$

D_o	=	Zerfälle pro Minute
SK	=	Anzahl der Silberkörner pro Flächeneinheit
d	=	1/Empfindlichkeit oder 100/ %Zählausbeute (Die Empfindlichkeit ist definiert als die Zahl der entwickelten Silberkörner im Autoradiogramm zur Anzahl der Zerfälle im Präparat)
$t^{1/2}$	=	Halbwertszeit des Isotops (für ^{125}J = 60 Tage)
t	=	Expositionszeit in Tagen
M	=	Moleküle Insulin
N	=	Loschmidtsche Zahl
SA	=	Spezifische Radioaktivität des Tracers

Bis zur Erstellung eines geeigneten Testpräparates, das die vorliegende Präparatgeomtrie berücksichtigt, legen wir die von FERTUCK & SALPETER (1974) publizierten Empfindlichkeiten , die an Dünnschnittpräparaten gemessen wurden, der Berechnung zugrunde. Dabei wurde die Abhängigkeit der Zählausbeute von der Strahlendosis bei Mikrodol X-Entwicklung berücksichtigt. Da wir nachweisen konnten , daß der überwiegende Anteil des Signals von der der Photoschicht zugewandten Zelloberfläche stammt und somit von den niederenergetischen Elektronen verursacht wird, erscheinen die an Dünnschnittpräparaten ermittelten Empfindlichkeitswerte für unsere Präparatgeometrie in erster Näherung übertragbar.

4. Kurze Zusammenfassung von Abschnitt II

Untersuchungen über die Verteilung von Insulinrezeptoren auf Zelloberflächen sind an Zellausstrichpräparaten mittels ^{125}J-Autoradiographie möglich. Unter Verwendung dünner Photoschichten (150 nm) tragen die von ^{125}J emittierten niederenergetischen

Elektronen mit 80-85 % zum Signal bei. Diese Elektronen vermitteln die gewünschte Ortsinformation.

Da für biochemische Untersuchungen und für die autoradiographische Darstellung derselbe Tracer - nämlich ^{125}J-Insulin - verwendet werden kann, ist ein valider Vergleich der Meßdaten grundsätzlich möglich. Zwei Vorbedingungen müssen jedoch eingehalten werden. Erstens müssen im autoradiographischen Präparat die gleichen Bindungsorte vorliegen wie in dem zu vergleichenden biochemischen Meßansatz. Untersuchungen über die quantitative Fixierung der Insulin-Bindungsstellen haben sichergestellt, daß diese Bedingung eingehalten werden kann. Zweitens müssen die photographischen Bedingungen reproduzierbar und eichbar sein, um eine quantitative Auswertung zu erlauben. Es ist mit Hilfe einer Stripping-Film-Technik gelungen, für Zellausstrichpräparate homogen verteilte Monoschichten der Photoemulsion herzustellen, die sich für eine quantitative Auswertung eignen.

Da die Autoradiogramme nicht nur im Lichtmikroskop, sondern auch im Raster-Elektronenmikroskop ausgewertet werden können, sind die Anforderungen an die Auflösung, die mit den derzeitigen Präparationstechniken erzielbar ist, voll abgedeckt.

III ERGEBNISSE

1. Nachweis von Insulin-Rezeptor Komplexen auf isolierten Leberzellen.

1.1 Fragestellung

Über Leber als Zielgewebe für Insulin liegen zahlreiche biochemische Arbeiten vor, die sich mit dem ersten Schritt der Hormonwirkung befassen, mit der Bindung des Insulins an den spezifischen, in der Plasmamembran lokalisierten Rezeptor.

Für diese Bindungsstudien werden häufig isolierte Leberparenchymzellen (FREYCHET et al. 1974; OLEFSKY et al. 1975; LE CAM et al. 1975, 1976; TERRIS und STEINER 1975; VARANDANI und NAFZ 1976; GAMMELTOFT et al. 1978), aber auch partikuläre Plasmamembranfraktionen (FREYCHET 1974, 1976; FREYCHET et al. 1972; KAHN et al. 1974; RÖSEN et al. 1979) sowie solubilisierte Fraktionen von Plasmamembranen (CUATRECASAS 1972; KÜHN et al. 1979) verwendet. Seltener werden Bindungsdaten an perfundierten Lebern erhoben (TERRIS und STEINER 1976). In der Regel werden die gewonnenen Daten für die Plasmamembran der Parenchymzelle verallgemeinert, obwohl im Falle der perfundierten Leber die Messung über das gesamte, aus verschiedenen Zelltypen bestehende Gewebe integriert. Diese Heterogenität kann sich auch in der Zusammensetzung der Plasmamembranfraktionen niederschlagen. Auch hier integriert die Messung über Plasmamembranen von verschiedenen Zelltypen, ohne die jeweiligen Bindungsanteile gewichten zu können. Diese Tat-

sache wird jedoch nur vereinzelt kritisch aufgegriffen (DE PIERRE und KARNOVSKY 1973; OLEFSKY et al. 1975; CUATRECASAS und HOLLENBERG 1976). Bei Bindungsstudien an reinen Hepatozytenpopulationen wird dieses Problem umgangen. In einem System von morphologisch einheitlich erscheinenden Zelltypen interessiert jedoch zusätzlich, ob alle Zellen mit einem vergleichbaren Rezeptorbesatz ausgestattet sind.

Eine Differenzierung, die sich einmal auf den Rezeptorbesatz unterschiedlicher Zelltypen und einmal auf Unterschiede im Rezeptorbesatz innerhalb einer morphologisch einheitlichen Population konzentriert, kann nur mittels morphologischer Methoden erfolgen. Mit der von uns entwickelten Technik läßt sich die Anzahl von Insulin-Rezeptor Komplexen auf der Einzelzelle bestimmen. Die Methode ist empfindlich genug, um auch die Insulinbindung bei niederen Hormonkonzentrationen (ab ca. 10^{-10} mol/l) darzustellen. Wir können damit erstmals das Bindungsverhalten von Hepatozyten bei physiologischen Insulinkonzentrationen differenziert beschreiben und mit dem von Nichtparenchymzellen vergleichen.

Weiterhin ist bisher ungeklärt, ob der Insulinrezeptor in differenzierten Plasmamembranabschnitten der Hepatozyten-Oberfläche lokalisiert ist. Aufgrund morphologischer Charakteristika (z.B. DE PIERRE und KARNOVSKY 1973; ROUILLER 1965) werden Plasmamembranabschnitte unterschieden, denen unterschiedliche Funktionen zugeordnet werden. Außerdem ist in einer biochemischen Untersuchung von WISHER und EVANS (1975) eine unterschiedliche Enzymausstattung für diese Plasmamembranbereiche beschrieben worden. In einer Fraktion, die vorwiegend Membranfragmente aus dem sinus-

oidalen Bereich enthält, ist eine vergleichsweise hohe Aktivität an glukagonstimulierbarer Adenylatcyclase gemessen worden. In der biliären Plasmamembranfraktion hingegen fehlte dieses Enzym. Es wäre denkbar, daß auch der Insulinrezeptor im Hinblick auf seine Funktion vorwiegend in den den Sinusoiden zugewandten Plasmamembranbereichen lokalisiert ist. Die Autoradiographie von Zellausstrichen erlaubt zwar keine molekulare Topographie des Rezeptorproteins, kann aber zwischen einer Ungleichverteilung, wie sie bei spezialisierten Rezeptordomänen vorliegen müßte und einer homogenen Verteilung unterscheiden und somit diese noch ungeklärte Frage beantworten.

1.2 Isolierung der Leberzellen

Isolierte Leberzellen wurden uns von Dr. N. Katz und Prof. K. Jungermann zur Verfügung gestellt. Die Zellen wurden nach der Methode von BERRY und FRIEND (1962) von Lebern männlicher, gefütterter Wistar-Ratten (160-180 g) isoliert. Eine detaillierte Beschreibung der für die Dissoziation des Lebergewebes verwendeten Enzyme und Medien findet sich bei KATZ und JUNGERMANN (1976).

1.3 Morphologische Charakterisierung der Zellpopulation

Zusammensetzung der Zellpopulation

Um das Bindungsverhalten von Parenchymzellen (Hepatozyten) und Nichtparenchymzellen (Endothelzellen, Kupffer'sche Sternzellen und Lipidspeicherzellen) vergleichen zu können, verwendeten wir eine Population mit einem sonst nicht üblichen, relativ hohen

Anteil an Nichtparenchymzellen.

Eine exakte Bestimmung des Anteils von Nichtparenchymzellen in einer Leberzellpopulation stößt auf Schwierigkeiten. Der relative Anteil der Nichtparenchymzellen wird bei einer Zellzahlbestimmung in der Neubauer Zählkammer grundsätzlich unterschätzt. Wie elektronenmikroskopische Aufnahmen zeigen (Abbildung 11), haftet ein großer Teil der Nichtparenchymzellen an Hepatozyten und kann ohne cytochemische Identifizierungshilfe bei einer Zählung in einer Zählkammer nicht erkannt werden. In der hier verwendeten Leberzellpopulation wurden in der Zählkammer beispielsweise nur~5 % Nichtparenchymzellen ermittelt. Der mit Toluidinblau gefärbte Semidünnschnitt von einer in Epon eingebetteten Zellpopulation eignet sich besser zur Differenzierung und Zählung der Nichtparenchymzellen. Wir haben in Semidünnschnitten 12 % Nichtparenchymzellen gezählt. In Zellausstrichautoradiogrammen haben wir, bezogen auf die gesamte Zellpopulation 15 % radioaktiv markierte Nichtparenchymzellen gezählt. Da vereinzelt auch nichtmarkierte Nichtparenchymzellen beobachtet werden, schätzen wir den gesamten Anteil der Nichtparenchymzellen zwischen 15-20 %.

Viabilität der Zellen

Die Viabilität der Zellen wurde mit Trypanblau getestet (TENNANT 1964). Bei frisch isolierten Leberzellen lag die Anfärbbarkeit mit Trypanblau bei 5 %. Nach einer Inkubationszeit von 60-120 Minuten bei 15^{o}C stieg der Anteil gefärbter Zellen auf ca. 10-15 %.

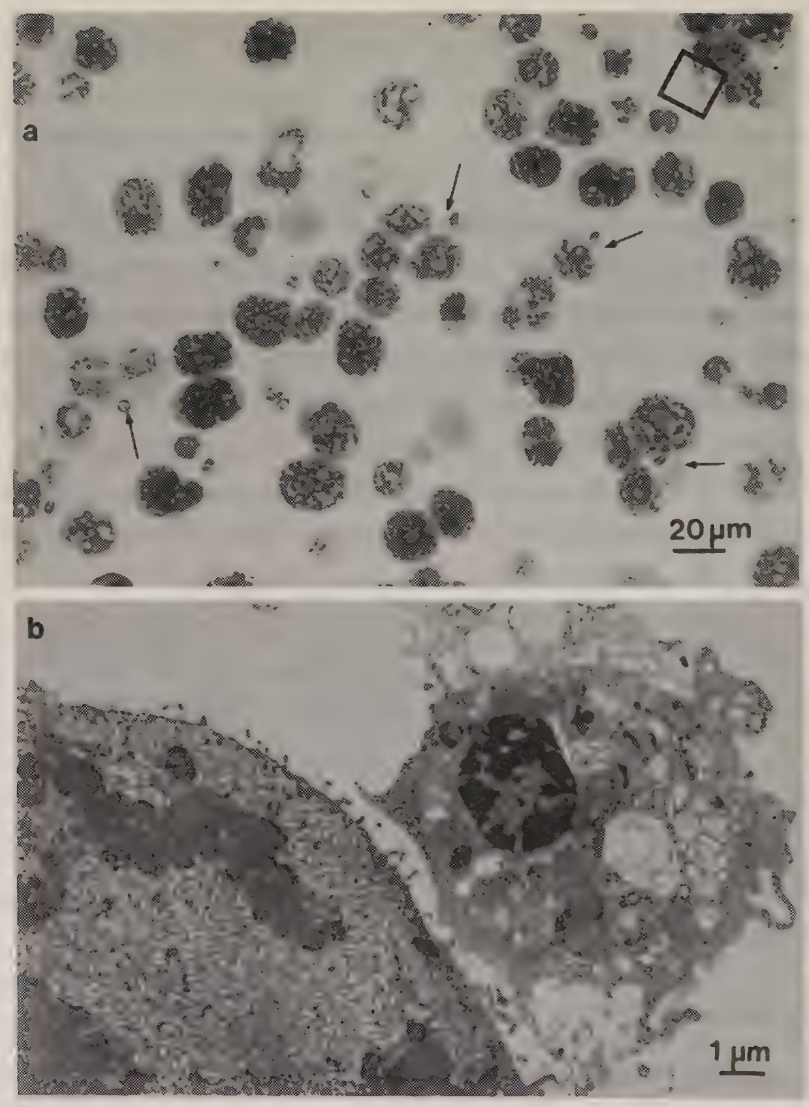


Abbildung 11

Isolierte Leberzellen

11 a:Semidünnschnitt, mit Toluidinblau gefärbt. Nichtparenchymzellen werden häufig an Hepatozyten anhaftend beobachtet.
11 b:Kupffer'sche Sternzelle auf einem isolierten Hepatozyten.

Erhaltungszustand der Feinstruktur der Zellen

Der Erhaltungszustand der Zellen soll anhand einiger elektronenmikroskopischer Aufnahmen verdeutlicht werden. Etwa 60-70 % der Hepatozyten zeigten die Feinstruktur, wie sie von nichtdissoziiertem Lebergewebe beschrieben ist (Abbildung 12), mit Ausnahme, daß die Zellen generell an Glykogen verarmt sind. Etwa 30 % der Hepatozyten weisen ein vesikuläres ‚rauhes endoplasmatisches Retikulum auf (Abbildung 13). Etwa 5 % der Hepatozyten sind im Zerfall begriffen. Ein für Bindungsstudien wichtiger elektronenmikroskopischer Befund ist, daß die Zelloberfläche weitgehend frei von anhaftenden Membranvesikel, die von untergehenden Zellen stammen können, ist. Nur vereinzelt finden sich Reste von Membranfragmenten zwischen den Mikrovilli der Hepatozyten-Oberfläche (Abbildung 12, Pfeil).

In der Fraktion der Nichtparenchymzellen lassen sich im Elektronenmikroskop Endothelzellen, Kupffer'sche Sternzellen, in geringer Zahl auch Lipidspeicherzellen, differenzieren (Abbildung 14). Die Zellen werden manchmal isoliert beobachtet, häufig aber aneinander haftend oder, wie bereits erwähnt, auf Hepatozyten aufsitzend (Abbildung 11).

1.4 Insulinbindung der isolierten Leberzellen (Markierung der Zellen für die Autoradiographie)

Wie bereits erwähnt, ist die Insulinbindung an Leberzellen ausführlich untersucht worden (FREYCHET et al. 1974; OLEFSKY et al. 1975; LE CAM et al. 1975, 1976; TERRIS und STEINER 1975; VARAN-

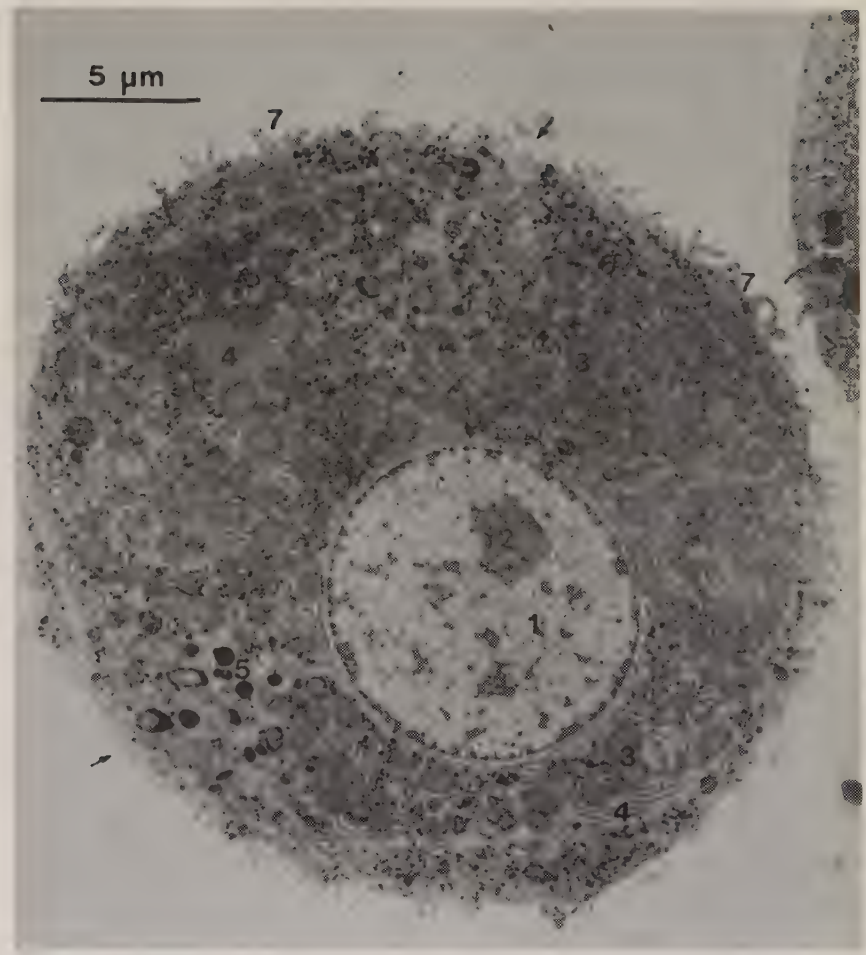


Abbildung 12

Beispiel für eine gut erhaltene isolierte Leberparenchymzelle.

In dieser Zelle ist Glykogen noch in Form von α-Partikeln nachweisbar. In den meisten Zellen ist kein Glykogen mehr nachzuweisen. (1) Kern, (2) Nukleolus, (3) Mitochondrien, (4) lamellenförmiges, rauhes endoplasmatisches Retikulum, (5) Lysosomen, (6) Glykogen, (7) Mikrovilli; nur vereinzelt haften noch Membranvesikel zwischen den Mikrovilli (Pfeil).

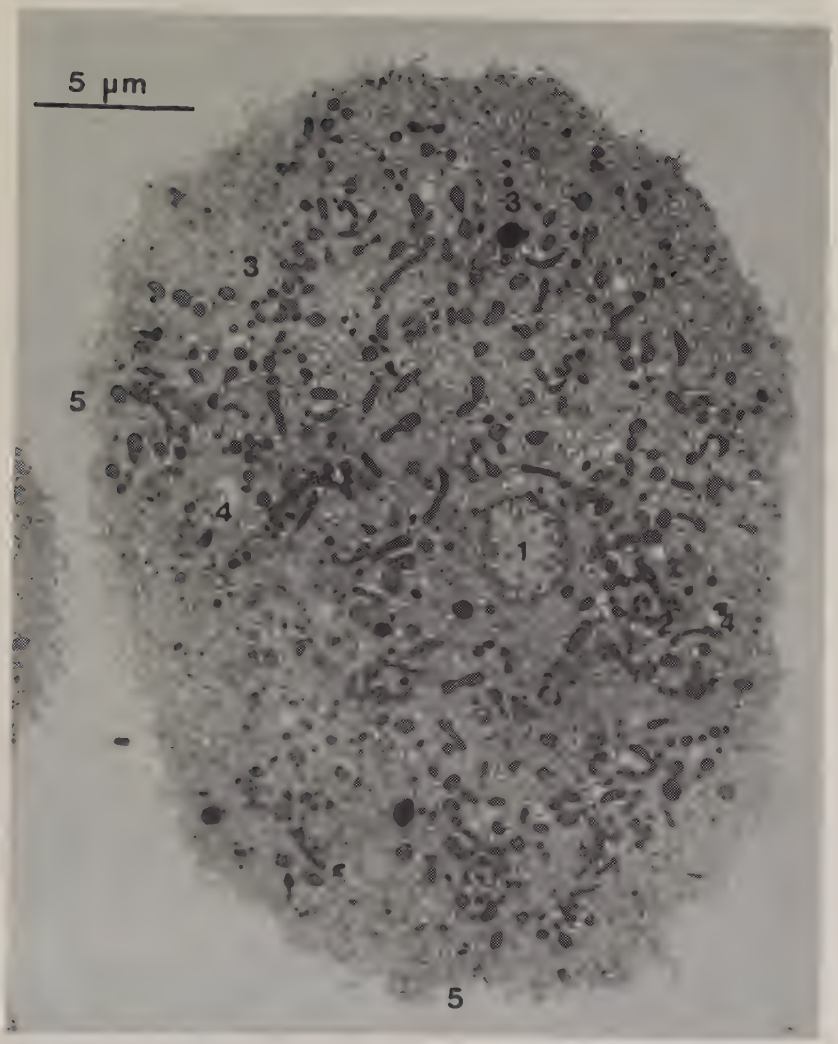


Abbildung 13

Beispiel einer isolierten Leberparenchymzelle mit vesikelförmig verändertem endoplasmatischem Retikulum.

(1) Kern, (2) Mitochondrien in kondensierter Form, "low energy state" nach HACKENBROCK, 1968, (3) vesikelförmiges endoplasmatisches Retikulum, (4) Vakuolen, (5) Mikrovilli.

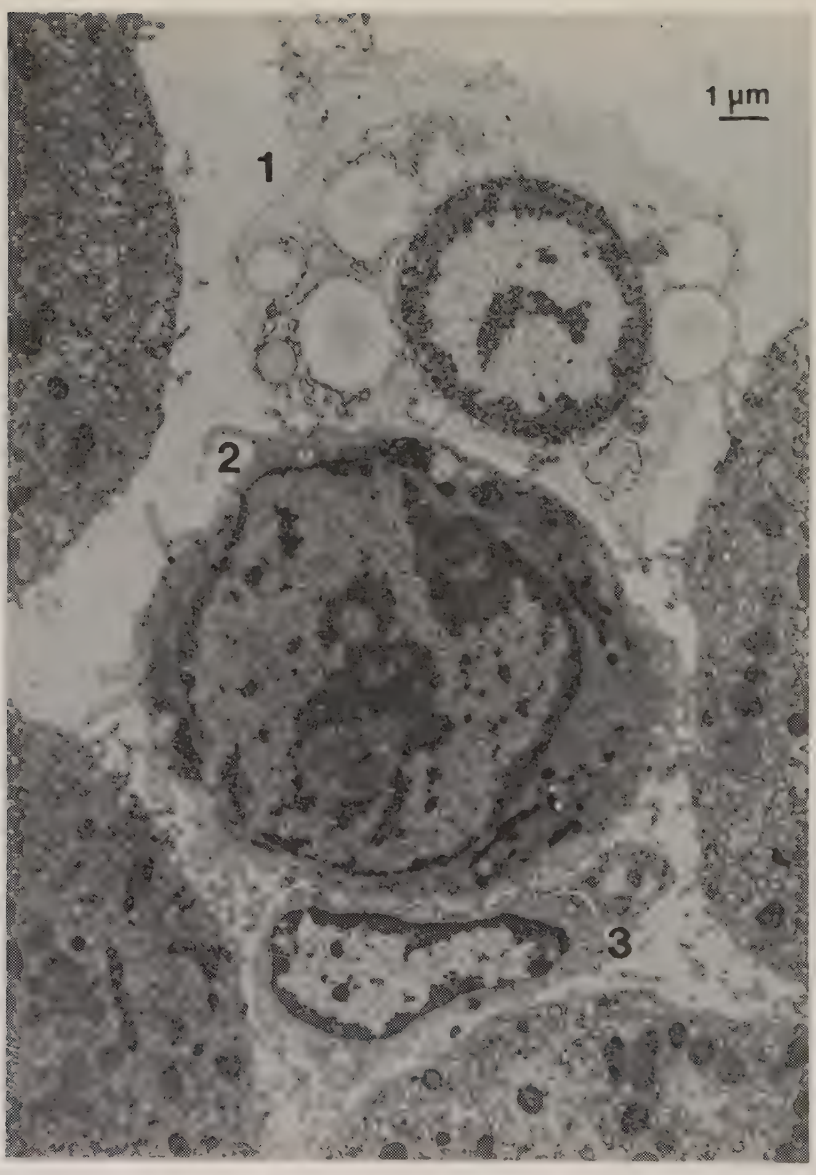


Abbildung 14

Nichtparenchymzellen

In der Zellsuspension werden alle Typen von Nichtparenchymzellen beobachtet. Im Bild (1) Lipidspeicherzelle, (2) Kupffer'sche Sternzelle, (3) Endothelzelle.

DANI und NAFZ 1976; GAMMELTOFT et al. 1978). Die folgenden Daten haben daher nur den Zweck, das von uns verwendete Zellsystem, das außerdem einen relativ hohen Anteil an Nichtparenchymzellen enthalten hat, zu charakterisieren.

Für Bindungsstudien wurden die Zellen in einem Hepes^{R}-Medium, pH 7.4 und 280 mosmol, das 1 % BSA enthielt, aufgenommen. Aus zähltechnischen Gründen (siehe oben) wurde jeweils nur die Anzahl der Hepatozyten bestimmt. Wenn Bindungswerte im folgenden auf 10^6Hepatozyten normiert sind, bedeutet das, daß gleichzeitig mindestens 1.8 x 10^5Nichtparenchymzellen anwesend waren, die bei der biochemischen Messung miterfaßt werden.

Die Zellpopulation zeigte eine lineare Abhängigkeit der Insulinbindung von der Zellzahl zwischen 0.5 x 10^6 und 3 x 10^6Hepatozyten pro ml.Als Standardkonzentration verwendeten wir in allen Bindungsansätzen 1 - 1.5 x 10^6 Zellen pro ml. Bei den vorgegebenen Bindungsbedingungen (Hepes^{R}- BSA-Medium, pH 7.4, 15^{o}) wurde das Bindungsgleichgewicht nach 90 Minuten erreicht (Abbildung 15a, Pfeil). Diese Inkubationszeit wurde für alle weiteren Versuche eingehalten. Innerhalb dieser Zeit wurden bei 15^{o}C und 10^6 Zellen/ml~10 % des eingesetzten Insulins abgebaut.
Die Beziehung zwischen Insulinkonzentration und Insulinbindung ist in Abbildung 15b über den uns interessierenden Insulinkonzentrationsbereich dargestellt.
Aus diesem Bereich haben wir für die Autoradiographie zwei Bindungsansätze bei Insulinkonzentrationen von 2.5 x 10^{-10}mol/l und 5 x 10^{-10}mol/l weiterverarbeitet (Abbildung 15b, Pfeile). Bei diesen Hormonkonzentrationen werden etwa 10-20 % aller zur

Verfügung stehenden Rezeptorstellen besetzt. Eine Sättigung aller Bindungsstellen wäre erst bei Insulinkonzentrationen>10^{-8}mol/l zu erreichen (LE CAM 1976). Wir haben aus verschiedenen Gründen die oben genannten Insulinkonzentrationen zur Markierung der Zellen für die Autoradiographie gewählt. Erstens liegen sie im sogen. "physiologischen Hormonkonzentrationsbereich". Zweitens geht aus der Scatchard-Analyse (SCATCHARD 1949) der Bindungsdaten an Hepatozyten (LE CAM et al. 1976) hervor, daß sich das Bindungsverhalten in diesem Bereich durch eine einzige Bindungskonstante, die in der Größenordnung von 10^9 M^{-1} liegt, beschreiben läßt. Drittens sollte ein niedriger Rezeptorbesatz entsprechend der Insulinkonzentration von 2.5 x 10^{-10} mol/l als Test dienen, um die Nachweisgrenzen der Methode abzustecken. Ein Vergleich beider Konzentrationen sollte dagegen über die Bestimmung relativer Korndichten im Autoradiogramm die Zuverlässigkeit der quantitativen Auswertung beschreiben. Da aber bei Mikrodol X-Entwicklung eine von der Strahlendosis abhängige autoradiographische Zählausbeute in Betracht gezogen werden muß (FERTUCK und SALPETER 1974), haben wir uns auf den Faktor 2 als Differenz der Markierungen beschränkt.

Die Hormonbindung ist partiell reversibel. Die Dissoziation des Hormons vom Rezeptor wird durch Zugabe von nativem Insulin bei 15°C beschleunigt (Abbildung 16 a). Durch Zugabe von Glutaraldehyd kann die Abdissoziation des Hormons vom Rezeptor verhindert werden. In den für die Autoradiographie vorgesehenen Proben wurde der Verlust an Radioaktivität während der Waschvorgänge gemessen (Abbildung 16b). Er ist unbedeutend (siehe hierzu auch Seite 18-20).

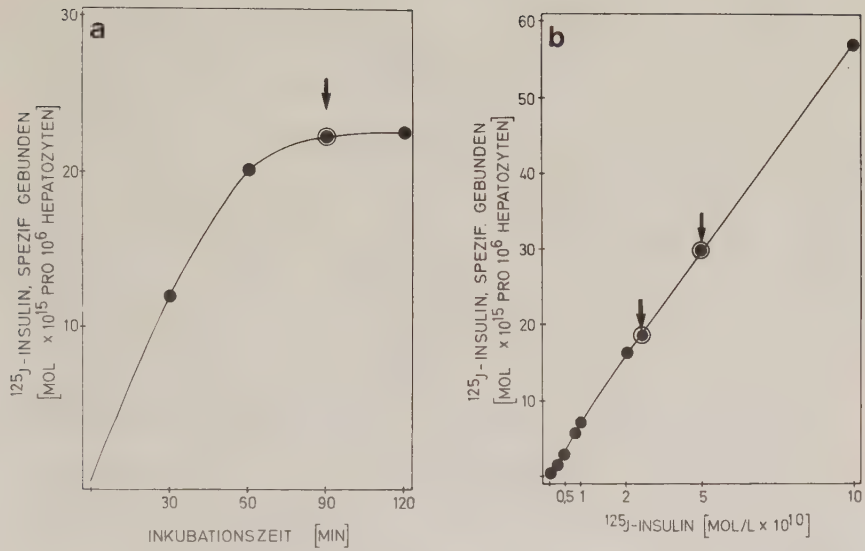


Abbildung 15

Insulinbindung an isolierten Leberzellen.

15a: Zeitabhängigkeit der Insulinbindung. 10^6 Hepatozyten pro/ml wurden mit 2 x 10^{-10} mol ^{125}J-Insulin pro l in Hepes^R-BSA-Puffer, pH 7.4, 280 mosmol, bei 15°C inkubiert.
15b: Abhängigkeit der Insulinbindung von der Insulinkonzentration. 10^6 Hepatozyten pro ml wurden in Hepes^R-BSA-Puffer, pH 7.4, 280 mosmol, 90 min bei 15°C mit steigenden Insulinkonzentrationen inkubiert.
Die unspezifische Bindung wurde jeweils in Parallelansätzen in Gegenwart von 10^{-6} mol nativem Insulin pro l bestimmt. Die Bindungswerte sind um den Betrag der unspezifischen Bindung korrigiert. Jeder einzelne Meßpunkt ist der Mittelwert einer Dreifachbestimmung.

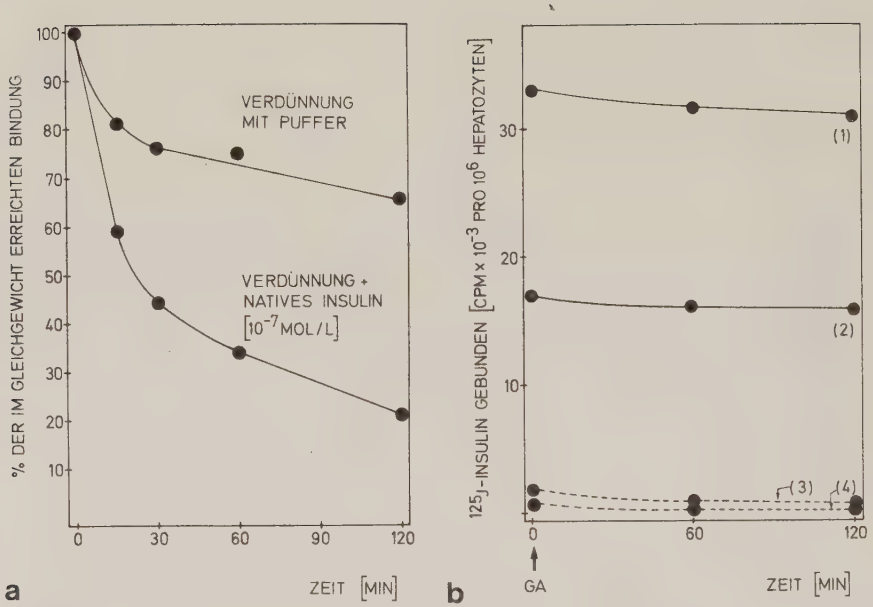


Abbildung 16

Dissoziation des gebundenen Insulins vom Rezeptor.

16a: 10^6 Hepatozyten pro ml wurden mit 2 x 10^{-10} mol ^{125}J-Insulin pro l 90 min bei 15°C in Hepes^R BSA-Puffer, pH 7.4, 280 mosmol inkubiert. Nach Erreichen des Bindungsgleichgewichtes wurde die Zellsuspension in Eis abgekühlt. Das freie Insulin wurde durch Zentrifugation abgetrennt. Die Zellen wurden zweimal in eiskaltem Puffer gewaschen, erneut in eiskaltem Puffer suspendiert (Endkonzentration 10^6 Hepatozyten pro ml), und in 1.5 ml Ansätze aufgeteilt (Zeitpunkt O). Die Ansätze wurden bei 15°C mit und ohne nativem Insulin über die angegebenen Zeitabstände inkubiert. Die zum Zeitpunkt O gemessene Radioaktivität wurde gleich 100 % gesetzt. Die Meßpunkte entsprechen Mittelwerten von Dreifachbestimmungen.

16b: 10^6 Hepatozyten pro ml wurden mit 2.5 x 10^{-10} mol und 5 x 10^{-10} mol ^{125}J-Insulin pro l unter den oben angegebenen Bedingungen inkubiert. In Parallelansätzen wurde in Gegenwart von 10^{-6} mol nativem Insulin pro l die unspezifische Bindung bestimmt. Nach Erreichen des Gleichgewichtes wurde das freie Insulin über Dichtegradienten bei 4°C abgetrennt. Die Zellsuspension wurde durch Austropfen fraktioniert und mit Glutaraldehyd fixiert. Die fixierten Zellen wurden zweimal in 60 min-Abständen gewaschen. Der Verlust an Radioaktivität wurde bestimmt. Die einzelnen Meßpunkte sind Mittelwerte von Dreifachbestimmungen.

1.5 Autoradiographie von Zellausstrichpräparaten (Lichtmikroskopische Analyse)

Analysiert wurden Autoradiogramme von Zellsuspensionen, die bei ^{125}J-Insulinkonzentrationen von 2.5 x 10^{-10} mol/l und 5 x 10^{-10} mol/l markiert wurden. Die spezifische Aktivität des Tracers war 100 µCi/µg.

Die Autoradiogramme von Zellen, die mit ^{125}J-Insulin markiert wurden, stellen die "Gesamtbindung" dar. Korndichten, die über den Zellen gezählt werden, repräsentieren die Summe aus "spezifisch gebundenem" plus "unspezifisch gebundenem" Insulin plus Emulsionshintergrund. Parallel dazu wurden Autoradiogramme ausgewertet, die - in Analogie zu biochemischen Bindungsanalysen - nur den Teil an gebundenem ^{125}J-Insulin darstellen, der in Gegenwart eines zehntausendfachen Überschusses an nativem Insulin noch an der Zelle haften bleibt und allgemein als Maß für die unspezifische Bindung angesehen wird (CUATRECASAS und HOLLENBERG 1976). Die in diesen Präparaten ermittelten Korndichten repräsentieren die Summe aus "unspezifisch gebundenem" Insulin und Emulsionshintergrund.

Da im Falle von Zellausstrichen im Vergleich zu Schnitten sehr großflächige autoradiographische Präparate vorliegen ($\sim$5 cm^2), ist der Emulsionshintergrund selten über die gesamte Präparatfläche hin gleich hoch. Um einen quantitativen Vergleich zu ermöglichen, sind daher nur Präparatareale für die Analyse verwendbar, in denen der Emulsionshintergrund vergleichbar ist.

Beim Durchmustern der Präparate fällt sofort die außerordentlich hohe Markierung der Nichtparenchymzellen auf (Abbildung 17 und 18).

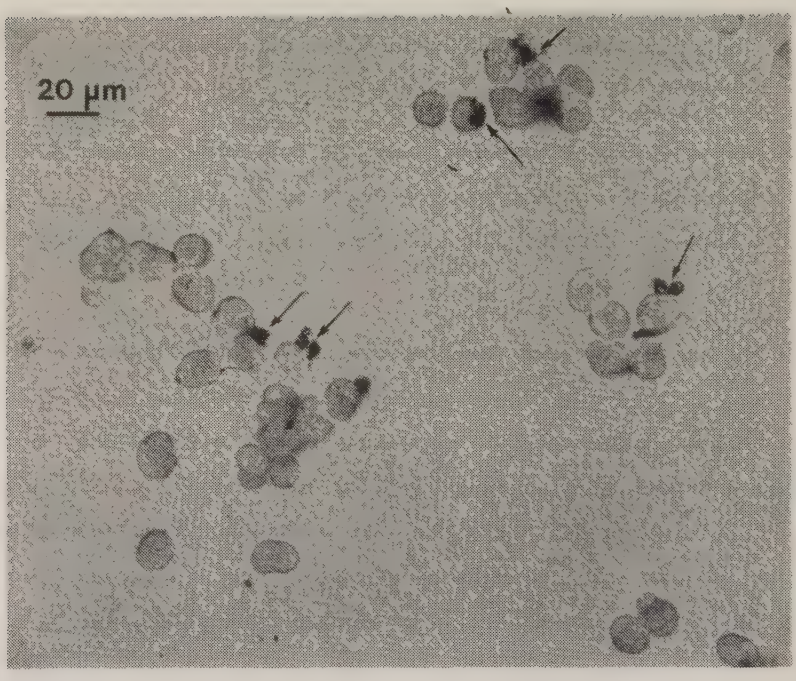


Abbildung 17

Autoradiographische Darstellung der Gesamtbindung von ^{125}J- Insulin an isolierte Leberzellen. Zellausstrich, Übersicht.

Bindungsbedingungen: 90 min Inkubation in Hepes^{R}-BSA-Puffer, pH 7.4, 280 mosmol, bei 15° C . ^{125}J-Insulinkonzentration: 5 x 10^{-10} mol/l, SA 100 µCi/ µg.
Autoradiographische Bedingungen: Expositionszeit 15 Tage; Entwicklung in Mikrodol X,7 min,RT.
Abbildung:Durchlicht , Hellfeld. Die Nichtparenchymzellen haften an Hepatozyten , heben sich aber deutlich durch die starke Markierung ab (Pfeile).

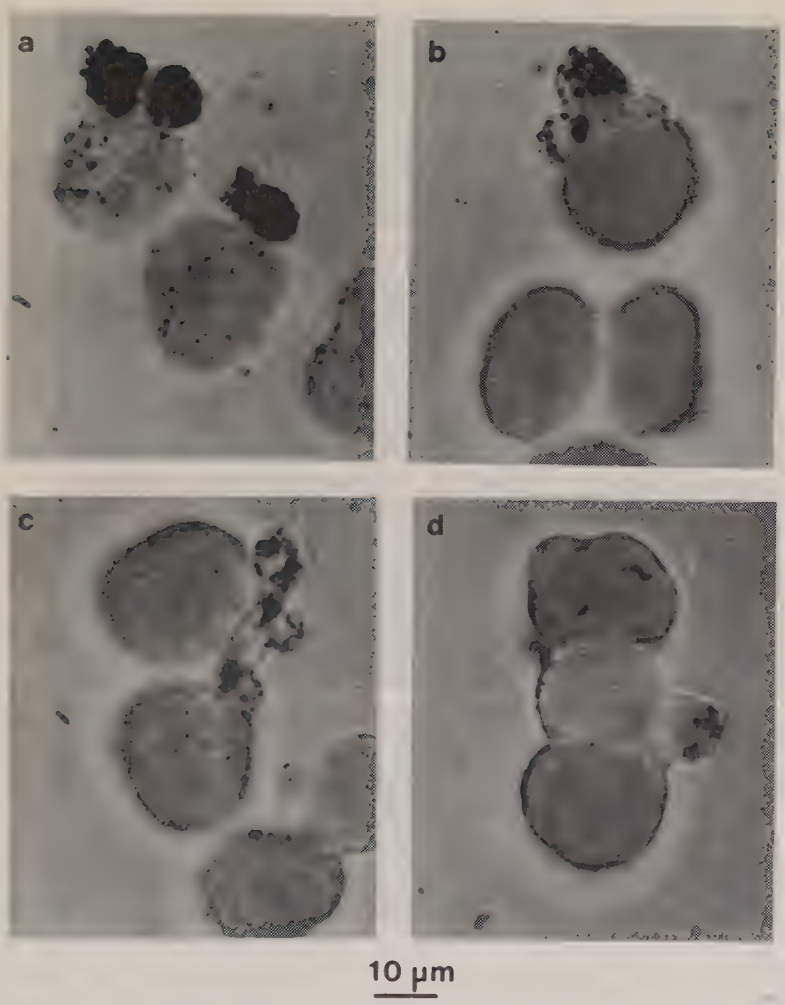


Abbildung 18

Autoradiographische Darstellung der ^{125}J-Insulin-Bindung an Nichtparenchymzellen im Zellausstrichpräparat.

Bindungsbedingungen: 90 min Inkubation in Hepes^{R}-BSA-Puffer, pH 7,4, 280 mosmol, bei 15°C. ^{125}J-Insulinkonzentration: 5×10^{-10} mol/l, SA 100 µCi/µg.
Autoradiographische Bedingungen: Expositionszeit 15 Tage; Entwicklung in Mikrodol X, 7 min, RT.
Abbildung : Durchlicht , Hellfeld, Ölimmersion.
18a und b: Gesamtbindung; 18c und d: unspezifische Bindung.

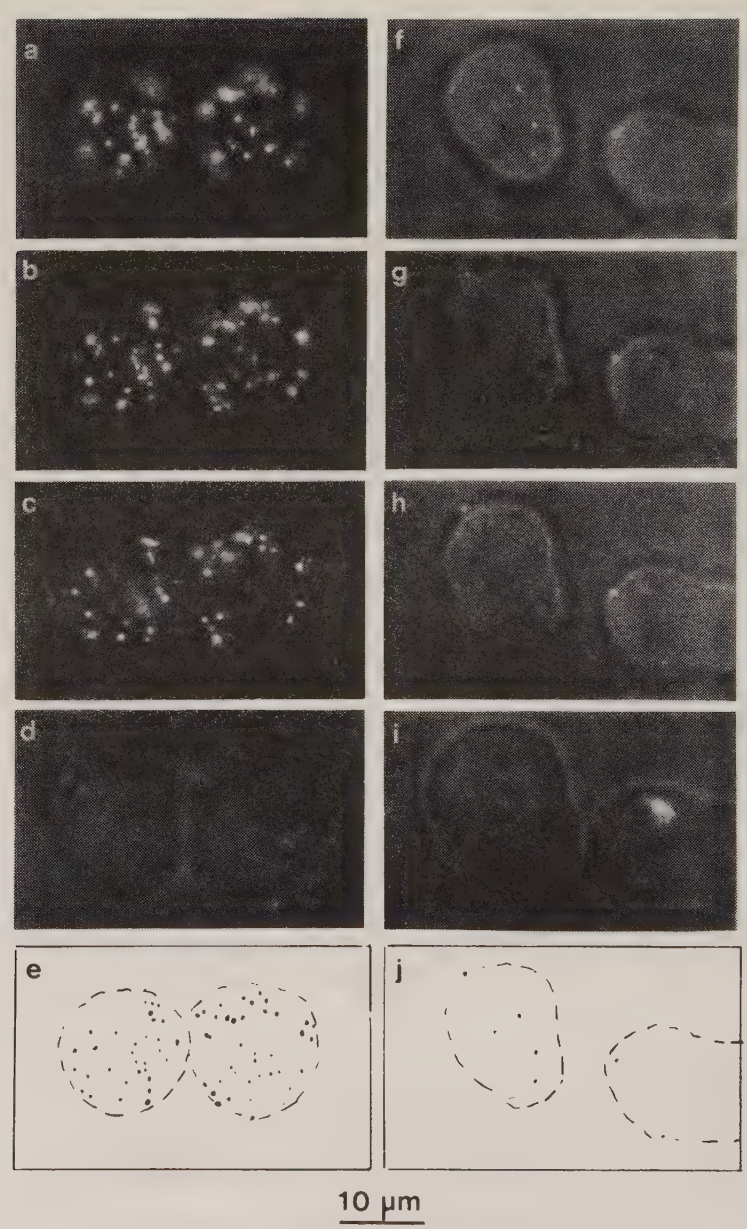


Abbildung 19

Abbildung 19

Autoradiographische Darstellung der Insulin-Rezeptor Komplexe auf Hepatozyten-Oberflächen.

Bindungsbedingungen: 90 min Inkubation in Hepes^{R}BSA-Puffer,pH 7.4, 280 mosmol,bei 15°C. ^{125}J-Insulinkonzentration: 5 x 10^{-10} mol/l, SA 100 µCi /µg.
Autoradiographische Bedingungen: Expositionszeit 15Tage; Entwicklung in Mikrodol X, 7 min, RT. Siehe auch Tabelle 4.
19 a-e: Gesamtbindung, 19f-i: unspezifische Bindung.
19a-c und 19f-h:Fokusserien in 1 µm Stufen von der Spitze der Zelle beginnend. 19d und 19 i: Emulsionshintergrund an der Basis der Zelle. 19e und 19j:Superpositionsmuster. Abbildung : Auflicht plus Durchlicht , Hellfeld, Ölimmersion.

Die quantitative Analyse von Nichtparenchymzellen ist derzeit noch nicht abgeschlossen. Aus den bisherigen Untersuchungen läßt sich jedoch bereits abschätzen (siehe auch Abbildung 18a und b), daß diese Zellen im Gesamtbindungsansatz eine mehr als zehnmal höhere Konzentration des Labels pro Flächeneinheit aufgenommen haben als Parenchymzellen. Das Label scheint, wie sich anhand des Verteilungsmusters der Silberkörner in einigen Fällen erkennen läßt, zum Teil unregelmäßig verteilt zu sein (Abbildung 18b). Bei Nichtparenchymzellen liegt außerdem der "unspezifisch gebundene" Anteil an Insulin wesentlich höher als bei Parenchymzellen (Abbildung 18c und d, vergleiche Abbildung 19 f-j).

Eine Differenzierung zwischen Endothelzellen, Kupffer'schen Sternzellen und Lipidspeicherzellen ist im Autoradiogramm bisher nicht möglich. Dazu müßten histochemische Differenzierungsmethoden entwickelt werden, die auch in Kombination mit Autoradiographie durchführbar wären.

Für Hepatozyten liegt eine quantitative Auswertung der Autoradiogramme vor (Abbildung 19 und 20).

Zum Verständnis der Abbildungen 19 und 20 sei hier kurz das Vorgehen bei der Auswertung wiederholt:
Die Zellkuppen der einzelnen Hepatozyten wurden in drei aufeinanderfolgenden Fokusebenen in je 1 µm Differenz bei 1000facher Vergrößerung mit Ölimmersion im Mischlicht abgebildet (Abbildung 19 a-c und f-h). Der Emulsionshintergrund wurde neben der Zellbasis registriert (Abbildung 19 d und i). Die Silberkörner wurden von allen vier Aufnahmen ortsgetreu auf Transparentfolie übertragen. Als Bezugsfläche (Projektionsfläche) wurde die Zellfläche der dritten Fokusebene auf Folie übertragen (Superpositionsbilder, siehe Abbildung 19 e und j). Ausgehend von der mittleren Größe eines kugelförmigen, luftgetrockneten Hepatozyten (Tabelle 3) wird mit den Aufnahmen von der Zellkuppe etwa 1/5 der gesamten Hepatozyten-Oberfläche abgebildet. Die Projektionsfläche ist im Durchschnitt 83% des abgebildeten Oberflächenabschnitts oder $100/\mu m^2$ Projektionsfläche entsprechen $120/\mu m^2$ Zelloberfläche.

Die relative Häufigkeit der über den Zellen beobachteten Korndichten wurde auf 100 μm^2 projizierte Fläche normiert und in Histogrammen dargestellt: in Abbildung 20a für die Bindung bei der ^{125}J-Insulinkonzentration von 2.5×10^{-10} mol/l und in Abbildung 20b für die Bindung bei der ^{125}J-Insulinkonzentration bei 5×10^{-10} mol/l. In denselben Diagrammen sind die Kurvenverläufe von "unspezifischer Bindung" und von der Gesamtbindung nebeneinander dargestellt, um das Signal/Rausch-Verhältnis zu veranschaulichen. Die Gesamtbindung grenzt sich jeweils deutlich durch ein Maximum von der "unspezifischen Bindung" ab. Bei 2.5×10^{-10} mol ^{125}J-Insulin pro l liegen für 70 % aller Hepatozyten die Korndichten für die Gesamtbindung höher als die für die "unspezi-

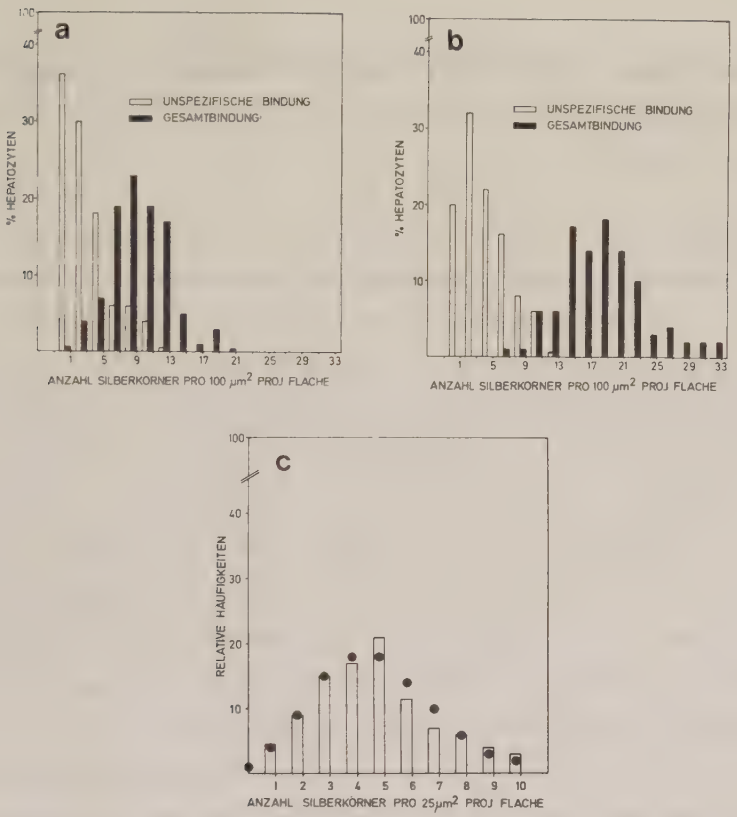


Abbildung 20

Verteilung der Silberkorndichten innerhalb der Hepatozytenpopulation, dargestellt in Histogrammen.

Bindungsbedingungen: 90 min, Inkubation in Hepes^{R} BSA-Puffer, pH 7.4, 280 mosmol, bei 15°C, SA 100 µCi/µg.
Autoradiographische Bedingungen: Expositionszeit:15 Tage, Entwicklung: Mikrodol X, 7 min, RT.
20a: ^{125}J-Insulinkonzentration 2.5 x 10^{-10} mol/l.
20b: ^{125}J-Insulinkonzentration 5 x 10^{-10} mol/l.
Die Anzahl der Silberkörner ist auf 100 µm^2 Projektionsfläche normiert. Zur Analyse der Gesamtbindung wurden 100 Zellen ausgewertet, zur Bestimmung der unspezifischen Bindung 50 Zellen. Der Emulsionshintergrund wurde in 200 Zählfeldern zu je 100 µm^2 bestimmt und beträgt 1.8 (20a) und 1.5 (20b) Silberkörner pro 100 µm^2. Sie auch Tabelle 4.
20c: Zur Prüfung auf Gleichverteilung wurde die Silberkornverteilung mit einem 25 µm^2 Raster ausgewertet (Histogramm-Säulen). Aus dem experimentell ermittelten Mittelwert wurde die Poissonverteilung errechnet. Die Kreise geben die berechneten Poisson-Werte an. (χ^2 = 3.02 , FG = 8).

fische Bindung. Bei 5 x 10^{-10} mol ^{125}J-Insulin pro 1 heben sich 90% aller Hepatozyten durch höhere Korndichten von der unspezifischen Bindung ab.

Die Silberkörner scheinen gleichmäßig auf der Zelloberfläche verteilt. Um auf Gleichverteilung zu prüfen, haben wir Autoradiogramme, die die Gesamtbindung bei 5 x 10^{-10} mol ^{125}J-Insulin pro 1 darstellen, mit einem 25 μm^2 Raster ausgewertet. Pro Hepatozyt wurden vier Felder gezählt. Das entspricht etwa der Fläche, die in der ersten Fokusebene abgebildet wird, so daß die Krümmung der Zelloberfläche in der Projektion vernachlässigbar ist. Insgesamt wurden 100 Zellen auf diese Weise ausgewertet. Bei einer Gleichverteilung der Strahlquellen auf der Zelloberfläche müßte die Verteilung der Silberkörner einer Poissonverteilung folgen.Dabei wird davon ausgegangen daß die Verteilung der Strahlquellen auf allen Zellen die gleiche ist, d.h. eine Poissonverteilung mit gleichem Mittelwert. Wir haben daher die empirisch gefundene Verteilung mit einer aus dem Mittelwert der beobachteten Korndichten berechneten Poissonverteilung verglichen. Abbildung 20c zeigt eine sehr gute Übereinstimmung von empirischer und berechneter Ver - teilung.

Da einmal über 70 % (2.5 x 10^{-10} mol ^{125}J-Insulin/l) und einmal über 90 % (5 x 10^{-10} mol ^{125}J-Insulin/l) aller Hepatozyten spezifisch markiert sind und da eine Gleichverteilung der Strahlquellen (= ^{125}J-Insulin-Bindungsstellen) angenommen werden kann, schließen wir erstens spezialisierte Rezeptordomänen in der Plasmamembran des isolierten Hepatozyten aus. Zweitens können wir unter diesen Gegebenheiten aus den in Abbildung 20a und b dargestellten Meßwerten auf die mittlere Anzahl von Insulin-Rezeptor

Komplexen pro Hepatozyt extrapolieren. Als mittlere Oberfläche eines luftgetrockneten Hepatozyten werden 1000 μm^2 eingesetzt (siehe Tabelle 3). Die Berechnung der im Mittel pro Hepatozyt gebundenen Insulinmoleküle erfolgte nach den Formeln (1) und (2) auf Seite 41-42 unter der Annahme, daß die Zählausbeute 40-50 % beträgt. Die zur Berechnung verwendeten autoradiographischen und biochemischen Daten sind in Tabelle 4 zusammengestellt.

Im Durchschnitt werden pro Hepatozyt 3000-4000 (2.5×10^{-10} mol ^{125}J-Insulin/l) und 7000-8500 (5×10^{-10}mol ^{125}J-Insulin/l) Insulinmoleküle gebunden. Etwa 2700-3300 sowie 6000-7000 Insulinmoleküle repräsentieren spezifische Insulin-Rezeptor Komplexe.

1.6 Autoradiographie von Semidünnschnitten

Die Untersuchungen an Semidünnschnitten dienen lediglich der Kontrolle, ob ein Teil des Labels in die Zelle aufgenommen wurde. Unter Berücksichtigung der Charakterisitik der ^{125}J-Strahlung haben wir für die Autoradiographie zwei Schnittdicken eingesetzt, die um den Faktor 10 differieren (siehe Seite 40-41). Geht man von der Gesamtbindung der ^{125}J-Insulinkonzentration von 5×10^{-10} mol/l aus, so lassen sich pro Zelle etwa 0.03 cpm erwarten. Angenommen, es wurden 25 % des Labels internalisiert und homogen im Zellvolumen verteilt, so wären unter der Annahme der von FERTUCK und SALPETER (1974) gemessenen Empfindlichkeit in einem 0.5 µm dicken Querschnitt eines Hepatozyten nach einer Expositionszeit von 30-40 Tagen 3-5 Silberkörner als Signal zu erwarten, wobei das Signal noch hauptsächlich von niederenergetischen Elektronen verursacht wird. In 5 µm Schnitten müßten dagegen unter zunehmen-

der Beteiligung der höherenergetischen Elektronen der ^{125}J-Strahlung 5-10 Silberkörner als Signal registriert werden (Empfindlichkeit für Elektronen im 30 keV-Bereich siehe BACHMANN und SALPETER 1967). Es ist daher von vornherein ein sehr ungünstiges Signal Rausch-Verhältnis zu erwarten. Unter diesen Bedingungen haben wir keine Internalisierung des Labels beobachtet (Abbildung 21a und b).

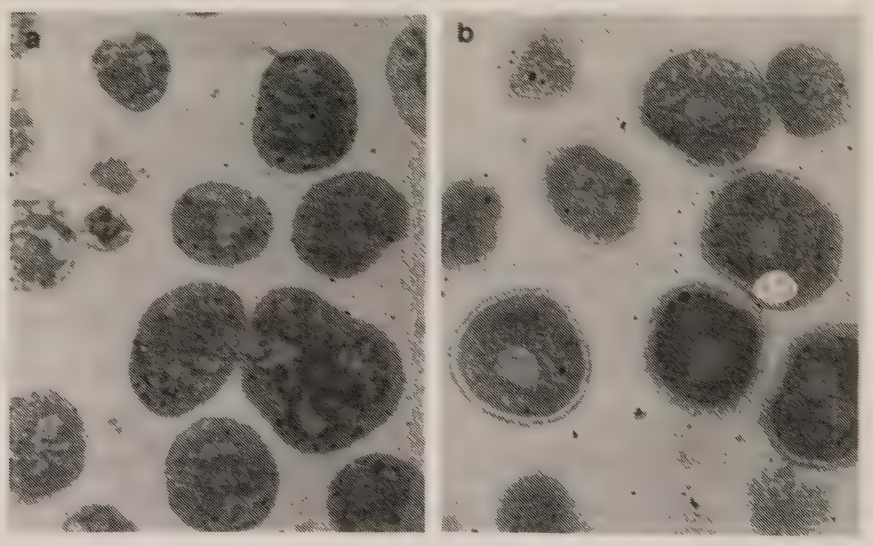


Abbildung 21

Autoradiogramme von Semidünnschnitten.

Bindungsbedingungen: 90 min Inkubation in Hepes^{R}-BSA-Puffer, pH 7.4, 280 mosmol bei 15°C. ^{125}J-Insulinkonzentration 5 x 10^{-10} mol/l, SA 100 µCi/µg.
Autoradiographische Bedingungen: Expositionszeit 60 Tage, Entwicklung: Mikrodol X, 7 min, RT.
21a: Schnittdicke 0.5 um, mit Toluidinblau gefärbt.
21b: Schnittdicke 5 um, ungefärbt.

Tabelle 4

Insulinbindung an isolierten Rattenleberzellen: biochemische und autoradiographische Daten.

	^{125}J-INSULIN: 5×10^{-10} mol/l		^{125}J-INSULIN: 1.5×10^{-9} mol/l	
	GESAMT-BINDUNG	UNSPEZIF. BINDUNG	GESAMT-BINDUNG	UNSPEZIF. BINDUNG
Markierung der Zellen:				
dpm / Standardpellet*	43000	900	21500	400
mol Insulin/ Standardpellet	11×10^{-15}	2×10^{-16}	16.5×10^{-15}	3.2×10^{-16}
Autoradiographie:				
Expositionsdauer (Tage)	15	15	15	15
Silberkörner / 100 µm² Zelloberfläche	16 ± 4.4 (100)	3.5 ± 2.4 (50)	8.3 ± 3.2 (100)	2.6 ± 2.1 (50)
Emulsionshintergrund (Silberkörner / 100 µm²)	1.5 ± 1.2 (200)	1.5 ± 1.2 (200)	1.8 ± 1.78 (200)	1.8 ± 1.78 (200)
Insulinmoleküle gebunden:				
pro 100 µm² Zelloberfläche	700 - 850	100 - 150	300 - 400	50 - 70
pro Hepatozyt	7000 - 8500	1000 - 1500	3000 - 4000	500 - 700

*Das Standardpellet besteht aus 10^6 Hepatozyten und 1.8×10^5 Nichtparenchymzellen. Die mittlere Oberfläche eines luftgetrockneten Hepatozyten ist 1000 µm². Es wurde eine autoradiographische Zählausbeute von 40-50% angenommen (siehe Seite 41-42).

1.7 Kurze Zusammenfassung der autoradiographischen Ergebnisse

Nichtparenchymzellen und Hepatozyten zeigen ein unterschiedliches Bindungsverhalten gegenüber Insulin.

Nichtparenchymzellen binden etwa zehnmal mehr Insulin als Hepatozyten. Der unspezifisch gebundene Anteil von Insulin ist wesentlich höher als bei Hepatozyten. Das Label scheint ungleichmäßig auf der Zelloberfläche verteilt zu sein. Einige Nichtparenchymzellen sind nicht markiert. Dieser nichtmarkierte Zelltyp kann im Zellausstrichautoradiogramm nicht identifiziert werden.

Die Hepatozytenpopulation weist einen relativ einheitlichen Rezeptorbesatz auf. Die gebundenen Insulinmoleküle sind gleichmäßig auf der ganzen Zelloberfläche verteilt. Abbhängig von der ^{125}J-Insulinkonzentration im Bindungsansatz werden im Durchschnitt pro Hepatozyt 3000 - 4000 Insulinmoleküle (^{125}J-Insulin: 2.5×10^{-10} mol/l) und 7000 - 8500 Insulinmoleküle (^{125}J-Insulin: 5×10^{-10} mol/l) gezählt. $\sim$ 2700-3300 Insulinmoleküle, respektive 6000 - 7000 Insulinmoleküle sind bei den oben angeführten ^{125}J-Insulinkonzentrationen spezifisch an Insulinrezeptoren komplexiert.

Eine Internalisierung des Labels konnte nicht nachgewiesen werden.

2. Nachweis von Insulin-Rezeptor Komplexen auf Monozyten

2.1 Fragestellung

Periphere mononukleäre Leukozyten werden in zunehmendem Maße verwendet, um die Regulation der Insulinrezeptoren und Rezeptordefekte am Menschen zu studieren. GAVIN et al. berichteten 1972 erstmals von einer spezifischen Insulinbindung an zirkulierende Blutzellen. Obwohl die Bindungswerte, bezogen auf die Zelloberfläche eines Lymphozyten im Vergleich zu anderen Zielzellen für Insulin um den Faktor 5-10 geringer waren, interpretierten die Autoren ihr Ergebnis als spezifische Bindung von Insulin an Lymphozyten. Die kleine Fraktion der Monozyten wurde nicht berücksichtigt. Die nachfolgenden Untersuchungen ergaben scheinbar widersprechende Ergebnisse. Diese Diskrepanzen können heute als Folge unterschiedlicher Anreicherungsverfahren für mononukleäre Leukozyten (Zentrifugation oder Säulenchromatographie) erklärt werden.

KRUG und Mitarbeiter (1972) konnten in einer über eine Nylonfasersäule gereinigte Lymphozytenpopulation keine Insulinbindung messen. Sie konnten in dieser Population erst nach einer durch Mitogene induzierten Transformation der Lymphozyten Insulinrezeptoren nachweisen. Diese Befunde ließen, zusammen mit den Ergebnissen von GAVIN et al. (1972), zwei Deutungen zu. Sowohl B-Lymphozyten (BOLDT et al. 1972) als auch Monozyten (= adhäsive Zellen) bleiben auf einer Nylonfasersäule haften. OLEFSKY und REAVEN (1974) spekulierten daher, daß die auf der Säule zurückbleibenden B-Lymphozyten die Insulin bindende Fraktion stellen müßten.

SCHWARTZ et al. (1975) lieferten dagegen die ersten fundierten Hinweise, daß Monozyten die Insulin-bindenden Zellen sind. Sie konnten durch spezifische Anreicherungsverfahren für Monozyten selektiv die Insulinbindung erhöhen. Die Autoren konnten außerdem autoradiographisch an Latex-phagozytierenden Monozyten ^{125}J-Insulin nachweisen. Die autoradiographischen Untersuchungen wurden jedoch nicht quantitativ durchgeführt. Außerdem ließen die photographischen Bedingungen keine Lokalisation des Tracers auf der Zelloberfläche zu.

Wir wollen in unseren Untersuchungen erstens quantitativ zwischen Insulin-bindenden und nicht bindenden Zellen unterscheiden, und zweitens die Verteilung der Insulinrezeptor-Komplexe auf der Oberfläche der einzelnen Zelle beschreiben.

2.2 Isolierung von mononukleären Leukozyten

Das Anreicherungsverfahren beruht auf dem von BØYUM (1968) beschriebenen Prinzip, nach dem Erythrozyten in Polysaccharidlösungen aggregieren und als Aggregate sedimentiert werden können, während weiße Blutzellen in Suspension bleiben und entsprechend ihrer Dichte fraktioniert werden können.

Nach BØYUM (1968, 1974, 1976) wird EDTA oder Heparin-Blut 1:2 v/v mit einem isotonen Medium verdünnt. Diese Mischung wird auf ein polysaccharidhaltiges Medium geeigneter Dichte, z.B. Lymphoprep^{R} ϱ = 1.077 g/ml überschichtet. Der diskontinuierliche Gradient wird 30 Minuten bei 400 x g (an der Phasengrenze Medium/Serum) zentrifugiert. Erythrozyten und Granulozyten sedimentieren,

Lymphozyten und Monozyten sowie eine große Anzahl Thrombozyten banden an der Phasengrenze Serum/Lymphoprep^{R}.

Die auf diese Weise angereicherten mononukleären Zellen enthalten unserer Erfahrung nach immer noch Erythrozyten, und wie bereits erwähnt, zahlreich Thrombozyten. Da vor allem letztere zu starken Verklumpungen mit den Monozyten führen und damit die Insulinbindung erheblich beeinträchtigen würden, haben wir folgende Modifikationen (Abbildung 22) zur Anreicherung einer Lymphozyten/Monozyten-Population eingeführt (JENNESSEN, Doktorarbeit 1980):

Die Verwendung einer leicht hypertonen Blut-Puffer-Mischung (330 mosmol) hat eine vollständigere Sedimentation der Erythrozyten im Lymphoprep^{R}-Gradienten zur Folge. Daher wurde Vollblut mit 380 mosmolarem Hank-Puffer 1:2 verdünnt auf Lymphoprep^{R} überschichtet und wie üblich zentrifugiert. Zur weiteren Reinigung wurde die, die mononukleären Leukozyten und zahlreiche Thrombozyten enthaltende Bande 1:2 mit isotonem Hank-Puffer, der 1 % BSA und 5 IE Heparin/ml enthielt, verdünnt. Die Zugabe von Heparin erwies sich als notwendig, da sich sonst aufgrund des Thrombozytengehaltes während der weiteren Reinigung Gerinsel bildeten. Die Zellsuspension wurde bei 900 x g 5 Minuten zentrifugiert. Das Pellet wurde in isotonem Hank/Heparin/BSA-Medium aufgenommen und über einen diskontinuierlichen Percoll^{TM}-Gradienten weiter gereinigt (Stufen folgender Dichten wurden verwendet: ϱ = 1.125 g/ml, ϱ = 1.07 g/ml, ϱ = 1.06 g/ml und ϱ = 1.04 g/ml). Nach 5 Minuten und 400 x g war zwischen den Stufen ϱ = 1.04 g/ml und ϱ = 1.06 g/ml eine diffuse Bande von Thrombozyten entstanden,

ANREICHERUNG VON LYMPHOZYTEN UND MONOZYTEN

AUS MENSCHLICHEM HEPARINISIERTEM BLUT

+ 1 VT HEPARINISIERTES VOLLBLUT
1 VT HANKS-PUFFER, 380 MOSMOL, PH 7.4
AUF LYMPHOPREP^{R} AUFTRAGEN

↓ RT
400 X G, 30 MIN

+ 1 VT BANDE (LYMPHOZYTEN, MONOZYTEN, THROMBOZYTEN)
1 VT HANKS-HEPARIN-BSA-PUFFER, 280 MOSMOL, PH 7.4

↓ RT
SEDIMENTATION BEI
900 X G, 5 MIN

SUSPENDIEREN DES PELLETS (SEDIMENT I) IN HANKS-HEPARIN-BSA-PUFFER, 280 MOSMOL, PH 7.4, AUFTRAGEN AUF PERCOLL^{TM}-GRADIENT

↓ RT
400 X G, 5 MIN

FRAKTIONIEREN DURCH AUSTROPFEN, SAMMELN DER MONONUKLEÄREN ZELLEN:

+ 1 VT BANDE
1 VT HANKS-BSA-PUFFER, 280 MOSMOL, PH 7.4

↓ RT
2 X WASCHEN DURCH SEDIMENTATION
900 G , 5 MIN

SUSPENDIEREN DES PELLETS (SEIMENT II) IM JEWEILIGEN INKUBATIONSMEDIUM

Abbildung 22

Schema der Präparationsschritte zur Anreicherung von Lymphozyten und Monozyten aus Heparin-Blut.

während sich zwischen ϱ = 1.06 und ϱ = 1.07 g/ml eine scharfe Bande der kernhaltigen Zellen ausgebildet hatte. Soweit noch Erythrozyten aus dem ersten Sediment vorhanden waren, bandeten diese zusammen mit wenigen kleinen Lymphozyten an der Phasengrenze zwischen ϱ = 1.07 g/ml und ϱ = 1.125 g/ml. Die Bande mit den mononukleären Zellen wurde durch Austropfen fraktioniert und ein bis zweimal in dem für die Insulinbindung verwendeten Puffer gewaschen.

Tabelle 5 gibt eine Übersicht über die Ausbeuten, die mit der zweistufigen Reinigung erzielt werden können.

Tabelle 5

Isolierung von Lymphozyten und Monozyten

	Zellzahl x 10^6	Ausbeute %
Leukozyten pro 100 ml Vollblut	645 ± 140	100
Sediment I (Lymphoprep^R)	212 ± 72	33
Sediment II (Percoll^{TM})	140 ± 66	22

Der Berechnung wurden Mittelwerte aus 15 Versuchen zugrunde gelegt. Die Ausbeute wurde in Bezug auf die Gesamt-Leukozytenzahl berechnet. Bezieht man auf den aktuellen Gehalt an Lymphozyten und Monozyten, so verbessert sich die Ausbeute im Mittel um den Faktor 2.

2.3 Morphologische Charakterisierung der Lymphozyten-Monozyten-Population

Zusammensetzung der Zellpopulation

Die Differenzierung der Zelltypen mittels der panoptischen Färbung nach PAPPENHEIM und im Elektronenmikroskop ergab folgende Zusammensetzung:

Der Monozytengehalt schwankte zwischen 10 und 20 %. Granulozyten wurden bei Präparationen,die von Vollblut mit normalen Granulozytenzahlen ausgingen, sowohl im Ausstrichpräparat als auch im Elektronenmikroskop nur sporadisch beobachtet. Bei stark erhöhter Anzahl der Granulozyten im Vollblut können diese in der Endsuspension in der Größenordnung von einigen Prozenten beobachtet werden. Bezogen auf die Gesamtzellzahl ist die Verunreinigung mit Erythrozyten in der Regel $<$ 1 %. Die Anzahl der Thrombozyten liegt im Durchschnitt bei ca. 50 pro 100 kernhaltigen Zellen. Sie werden hauptsächlich an Monozyten haftend bei der Zentrifugation mitgeschleppt. Abbildung 23 zeigt in Übersichtsvergrößerung eine Standardpräparation.

Viabilität der Zellen

Im Vitalitätstest mit Trypanblau (TENNANT 1964) wurden in der Regel weniger als 1 % gefärbter Zellen gezählt. Die Anfärbbarkeit stieg selbst nach langen Inkubationszeiten, bis zu mehr als 24 Stunden, nicht über 5 % an.

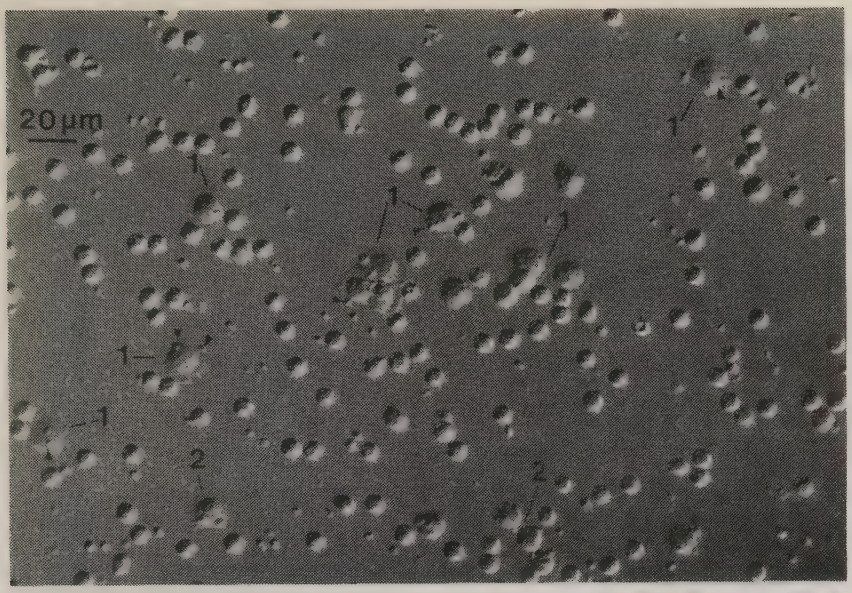


Abbildung 23

Interferenzkontrastaufnahme von einer frisch isolierten Suspension von Lymphozyten und Monozyten (ungefärbt, nicht fixiert). Übersichtsaufnahme. Die Monozyten spreiten auf der Glasunterlage. Ein Teil ist bereits gespreitet (1). Bei einigen beginnt der Spreitungsprozeß (2). Monozyten sind die größten Zellen der Population. Thrombozyten haften an den Monozyten häufig (Pfeile), an den Lymphozyten zufällig.

Erhaltungszustand der Feinstruktur der Zellen

Die Feinstruktur der Zellen war durchwegs gut erhalten und ließ eine Schädigung durch das Anreicherungsverfahren ausschließen. Die folgenden elektronenmikroskopischen Aufnahmen von den verschiedenen Zelltypen (Abbildungen 24-27) zeigen die üblicherweise beobachtete Qualität (zur Morphologie von Leukozyten, vgl. z.B. BESSIS 1973).

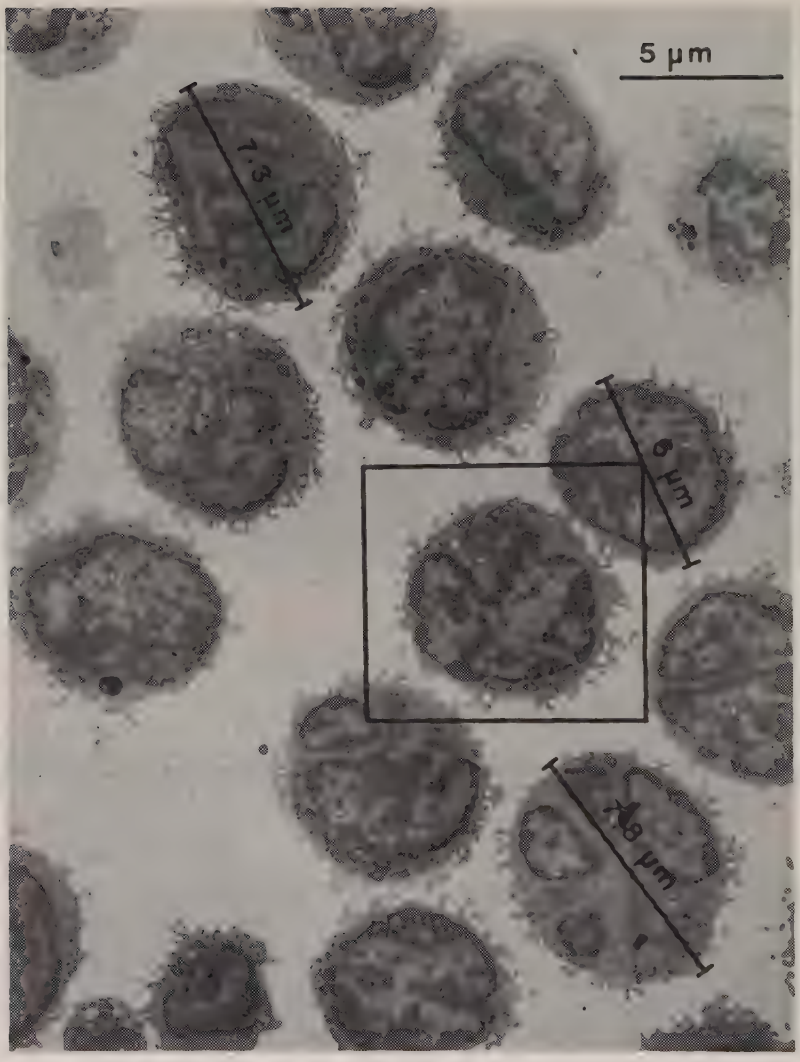


Abbildung 24

Areal von kleinen und mittelgroßen Lymphozyten.

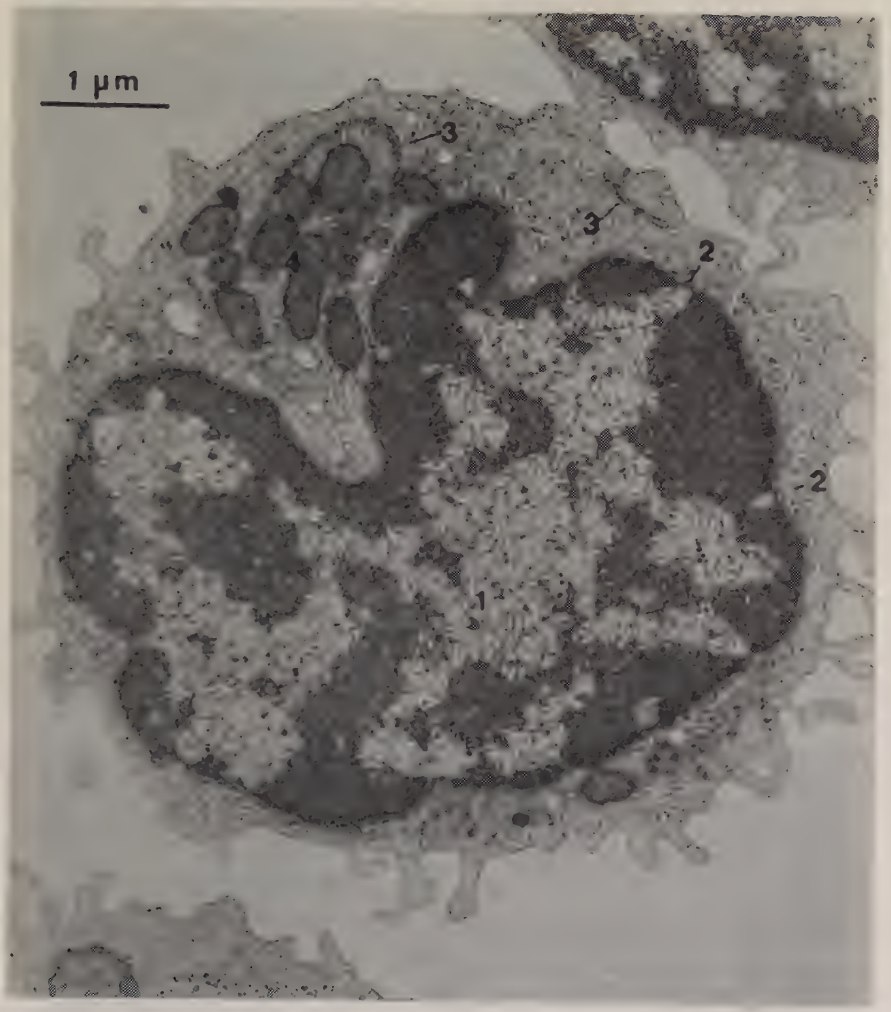


Abbildung 25

Vergrößerung des in Abbildung 24 eingezeichneten Ausschnitts Typischer Querschnitt durch einen mittelgroßen Lymphozyten.

Der große Kern (1) weist eine Einbuchtung auf. Kernporen (2) sind sichtbar. Typisch sind ferner kurze Profile des endoplasmatischen Retikulums (3) und wenige längliche Mitochondrien (4).

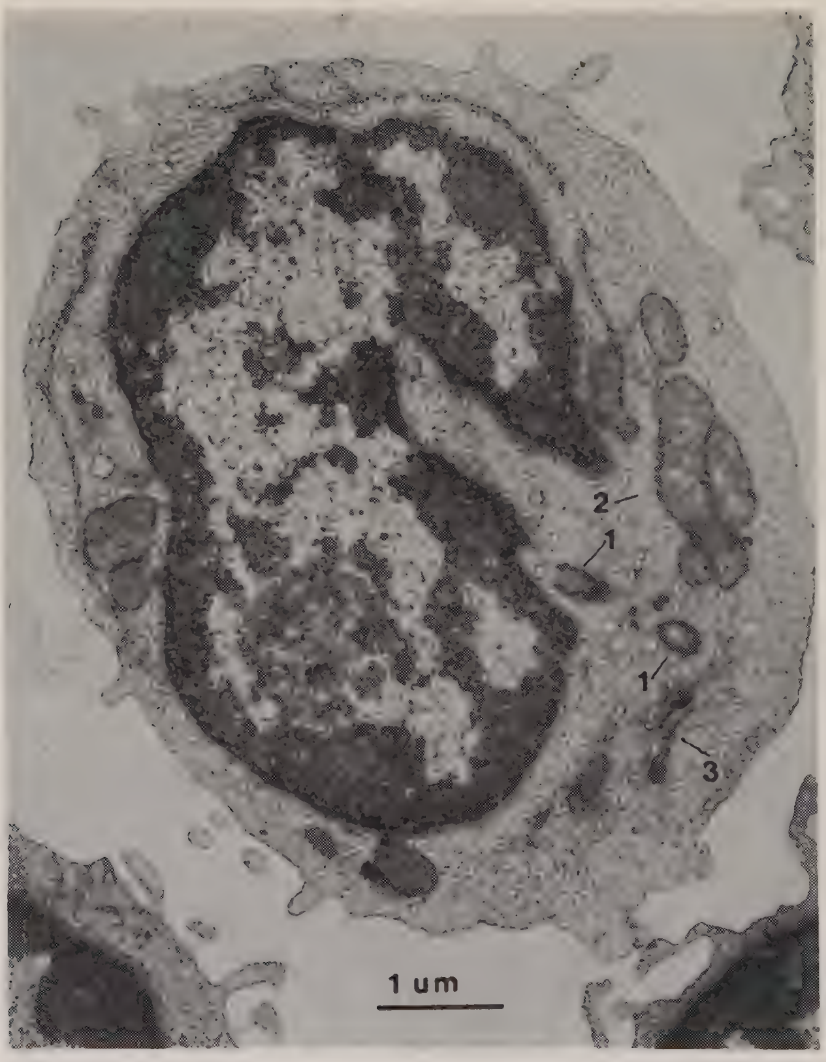


Abbildung 26

Mittelgroßer Lymphozyt.

Selten werden im Schnitt die zwei Zentriolen getroffen (1); davon ausgehend vereinzelt Mikrotubuli (2); in der Nähe der Zentriolen die Golgizone (3).

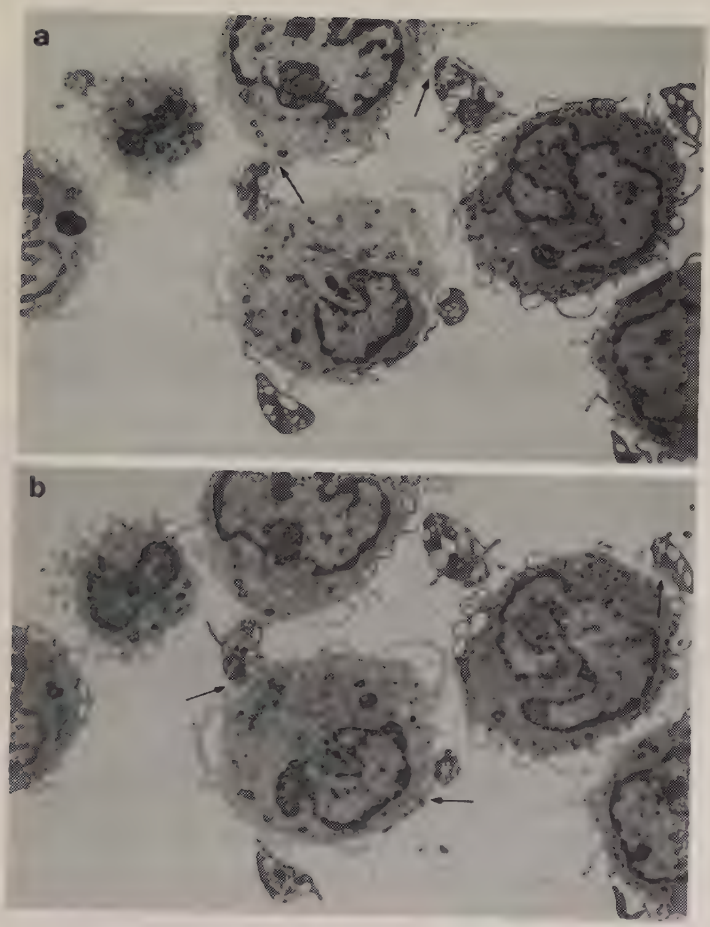


Abbildung 27

Folgeschnitte einer Gruppe von Monozyten.

In der Umgebung der Monozyten werden häufig Thrombozyten beobachtet. Vergleich hierzu Abbildung 24, Areal von Lymphozyten, das frei von Thrombozyten ist. Die Thrombozyten haften häufig an der Monozytenoberfläche (Pfeile) und verursachen die Bildung von Aggregaten.

2.4 Insulinbindung an Lymphozyten und Monozyten (Markierung der Zellen für die Autoradiographie)

Im Gegensatz zu Zellen, die aus Geweben freigesetzt werden, ist die Anreicherung von zirkulierenden Blutzellen bezüglich der Integrität des Systems reproduzierbarer und wesentlich weniger von experimentellen Imponderabilien abhängig. Wir haben daher auf eine umfangreichere Charakterisierung des Bindungsverhaltens der von uns benutzten Population verzichtet und folgende Inkubationsbedingungen aus der Literatur (DE MEYTS 1976a) übernommen:

20-30 x 10^6 mononukleäre Zellen pro ml (≙2 -4 x 10^6 Monozyten pro ml) wurden in Hepes^R-Puffer, pH 7.8, 300 mosmol, der 1 % BSA enthielt, 120 min bei 15°C inkubiert. Eine Kontrolle der Relation von Zellzahl und Insulinbindung ergab eine lineare Abhängigkeit zwischen 5 x 10^6 bis 35 x 10^6 mononukleären Zellen pro ml. Höhere Zellkonzentrationen wurden nicht mehr gemessen, da sie bei der Vielzahl von Ansätzen für Bindungsstudien nicht zu realisieren sind. Während einer Inkubationsdauer von 120 Minuten wurde bei 15°C und 30 x 10^6 Zellen pro ml kein Abbau von Insulin gemessen. Die Abhängigkeit der Insulinbindung von der Insulinkonzentration ist an einem Beispiel dargestellt (Abbildung 28). Der Bindungsansatz, der für die Autoradiographie weiterverarbeitet wurde, ist auch hier wieder durch einen Pfeil gekennzeichnet. Bei dieser Konzentration ist nur ein Teil der Insulinbindungsstellen besetzt. Eine Sättigung der Insulinbindungsstellen ist erst bei Insulinkonzentrationen ≥ 2 x 10^{-9} mol/l zu beobachten. Die Hormonbindung ist reversibel. Die Dissoziation des gebundenen Insulins vom Rezeptor kann jedoch durch Fixierung mit Gluta-

raldehyd verhindert werden (Abbildung 2).

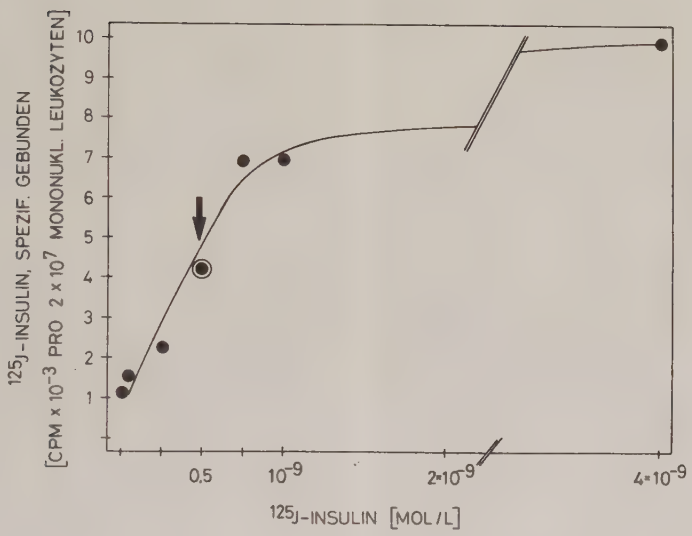


Abbildung 28

Insulinbindung an mononukleären Leukozyten in Abhängigkeit von der Insulinkonzentration.

Die Zellpopulation bestand aus 88 % Lymphozyten und 12 % Monozyten. 30 x 10^{6} Zellen pro ml wurden in Hepes^{R} BSA-Puffer, pH 7.8, 280 mosmol, bei 15 °C 120 min inkubiert.
Die unspezifische Bindung wurde in Parallelansätzen in Gegenwart von 10^{-6} mol/l nativem Insulin bestimmt. Die Meßpunkte sind die Mittelwerte von Doppelbestimmungen.

2.5 Autoradiographie von Zellausstrichpräparaten (Lichtmikroskopische Analyse)

Analysiert wurden Autoradiogramme, die die Gesamtbindung bei einer ^{125}J-Insulinkonzentration von 5 x 10^{-10} mol/l darstellen und Autoradiogramme, die die entsprechende unspezifische Bindung repräsentieren.

In Autoradiogrammen von der Gesamtbindung ist nur ein kleiner Teil der Zellpopulation markiert. Wir haben versucht, diese Zellen ohne selektive Färbemethoden, die im autoradiographischen Präparat prinzipiell schwierig durchzuführen sind, zu identifizieren. Da Zellsuspensionen verwendet wurden, die praktisch keine Granulozyten enthielten, war nur zwischen Lymphozyten und Monozyten zu differenzieren. Erythrozyten sind auch im autoradiographischen Präparat sofort aufgrund ihrer Diskus- oder Stechapfelform und Thrombozyten aufgrund ihrer Größe zu erkennen. Als Differenzierungsmerkmale für Lymphozyten und Monozyten haben wir Größe, Umriß und Aggregationsverhalten herangezogen. Diese Merkmale sind am deutlichsten im Interferenzkontrast zu beobachten. Monozyten sind die größten Zellen der vorliegenden Population, sie zeigen im autoradiographischen Präparat, in dem durch die Photoschicht die Zellkonturen etwas verunschärft sind, einen polygonalen Umriß, Lymphozyten erscheinen dagegen rund. Ihre Oberfläche ist unregelmäßiger als die der Lymphozyten. An ihrer Oberfläche haften häufig Thrombozyten, an Lymphozyten nicht. Aufgrund dieser Merkmale stellen Monozyten die radioaktiv markierte Fraktion dar (Abbildung 29).

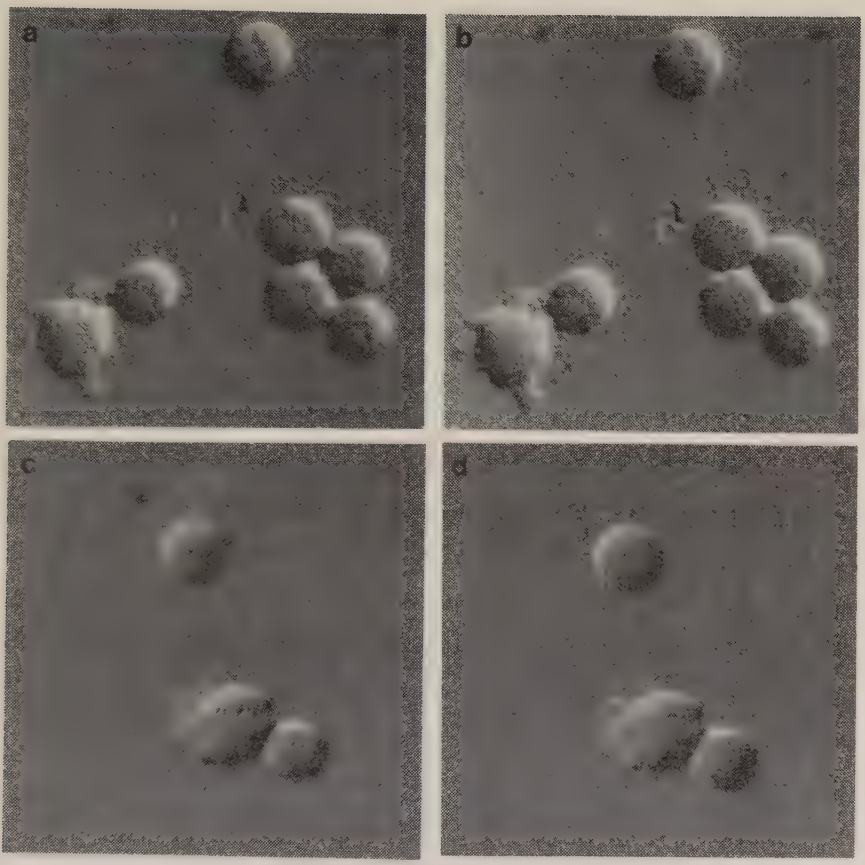


Abbildung 29

Autoradiographische Darstellung von Insulin-Rezeptor Komplexen auf Monozytenoberflächen.

Bindungsbedingungen: 120 min Inkubation in Hepes^{R}-BSA-Puffer, pH 7.8, 280 mosmol, bei 15^{o}C. ^{125}J-Insulinkonznetration 5 x 10^{-10} mol/l, SA 100 uCi/ug .
Autoradiographische Bedingungen: Expositionszeit 41 Tage;Entwicklung Mikrodol X,7 min, RT.
Abbildung: Interferenzkontrast, Ölimmersion .
29a und c: Abbildung der Zellspitze, 29 b und d:Abbildung der Zellbasis. Die markierten Zellen sind die größten der Population, ihre Konturen sind unregelmäßig. Häufig haften Partikel in der Göße der Thrombozyten an ihnen. Aufgrund dieser Merkmale haben wir diese Zellen als Monozyten identifiziert (siehe Text).

Während zur Identifizierung des markierten Zelltyps der Interferenzkontrast herangezogen wurde, wurden die einzelnen Silberkörner im Mischlicht (Hellfeld-Auflicht und Hellfeld-Durchlicht) bei 1000facher Vergrößerung unter Verwendung von Ölimmersion ausgezählt.

Monozyten sind im Vergleich zu Hepatozyten wesentlich kleiner und erscheinen im Zellausstrichpräparat leicht abgeflacht. Der mittlere Durchmesser von luftgetrockneten Monozyten ist $\sim$ 7 µm. Die Zellen sind $\sim$ 4-5 µm hoch. Die mittlere Zelloberfläche wird auf rund 150 μm^2 geschätzt. Drei aufeinanderfolgende Fokusebenen, mit je 1 µm Differenz bilden bereits etwa die Hälfte der Zelloberfläche ab. Die entsprechende mittlere Projektionsfläche beträgt 40 μm^2. Die Krümmung der Zelloberfläche kann in der Projektion der obersten Zellkuppe (1. Fokusebene) noch vernachläßigt werden, nicht mehr jedoch bei der Projektion der nachfolgenden Oberflächenabschnitte (2. und 3. Fokusebene). Aus diesem Grund wurde die Verteilung der Silberkörner in Aufnahmen von der obersten Zellkuppe beurteilt, während die durchschnittliche Anzahl der Silberkörner pro Zellhälfte bestimmt wurde.

Aus dem Histogramm (Abbildung 30) ist ersichtlich, daß die markierten Monozyten etwa 12 % der gesamten Zellpopulation ausmachen. Dieser im Autoradiogramm bestimmte Prozentsatz deckt sich mit dem Monozytengehalt, der im biochemischen Bindungsansatz nach den üblichen Kriterien bestimmt worden war. Bei 80 % der Monozyten wurden Korndichten zwischen 7 und 21 Silberkörner pro Zellhälfte beobachtet. Der Mittelwert liegt bei 14 Silberkörner pro Zellhälfte.

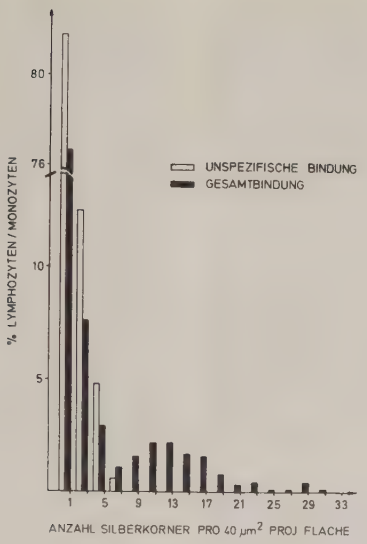


Abbildung 30

Verteilung der Silberkorndichten zwischen Lymphozyten und Monozyten.

Bindungsbedingungen: 120 min Inkubation in Hepes^{R}-BSA-Puffer, pH 7.8, 280 mosmol, bei 15^{o}C. ^{125}J-Insulinkonzentration 5 x 10^{-10} mol/l, SA 167 uCi/ug.
Autoradiographische Bedingunen: Expositionszeit 20 Tage, Entwicklung Mikrodol X, 3 min , RT.
Die Anzahl der Silberkörner ist auf 40 $/um^2$ Projektionsfläche normiert. Zur Bestimmung der Gesamtbindung und der unspezifischen Bindung wurden je 1000 Zellen ausgewertet. Der Emulsionshintergrund wurde in Zählfeldern zu je 40 $/um^2$ in zellfreien Gebieten ermitteltund beträgt o.3 Silberkörner pro 40 $/um^2$.
Siehe auch Tabelle 6.

Die mittlere Anzahl von Silberkörnern entpricht rund 400-450 gebundenen Insulinmolekülen pro Zellhälfte, wobei der unspezifisch gebundene Anteil unbedeutend ist. Die Berechnung der gebundenen Insulinmoleküle erfolgte unter Verwendung der Formeln (1) und (2) (Seite 41 und 42). Die Daten, die dafür verwendet wurden, sind in Tabelle 6 zusammengestellt. Die durchschnittliche

Strahlendosis pro um^2 wurde aus den biochemischen Meßwerten und der Expositionszeit geschätzt. Sie beträgt ca. 1.3 dpm/um^2. Bei Mikrodol X-Entwicklung liegen nach FERTUCK und SALPETER (1974) für diesen Dosisbereich die Zählausbeuten im Autoradiogramm bei 33 %. Diese Zählausbeute wurde bei der Berechnung verwendet.

Tabelle 6

Insulinbindung an mononukleären Leukozyten: biochemische und autoradiographische Daten.

	^{125}J-Insulin: Gesamtbindung	5×10^{-10} mol/l unspezifische Bindung
Markierung der Zellen		
dpm/ 10^7 mononukl. Zellen	8000	560
dpm/ 10^6 Monozyten	6600	460
mol Insulin gebunden/ 10^7 mononukl. Zellen	3.7×10^{-15}	0.26×10^{-15}
mol Insulin gebunden/ 10^6 Monozyten	3.1×10^{-15}	0.21×10^{-15}
Autoradiographie		
Expositionszeit (Tage)	20	20
Entwicklung Mikrodol X	7 min/22°C	7 min/22°C
Silberkörner pro 40 μm^2 Projektionsfläche (Monozyten)	14 + 5.17 (100)	< 1 (100)
Emulsionshintergrund/ 40 μm^2	< 1 (200)	< 1 (200)

Die Verteilung der Silberkörner erscheint auf einigen Zellen gleichmäßig (Abbildung 31 a,b)Bei zahlreichen Zellen scheinen die Silberkörner ungleichmäßig verteilt zu sein (Abbildung 31c-h). Bisweilen finden sich Anhäufungen von Silberkörner in "Cap"-Form, wobei die Korndichten zwei-bis dreimal höher sind als die mittlere Korndichte.

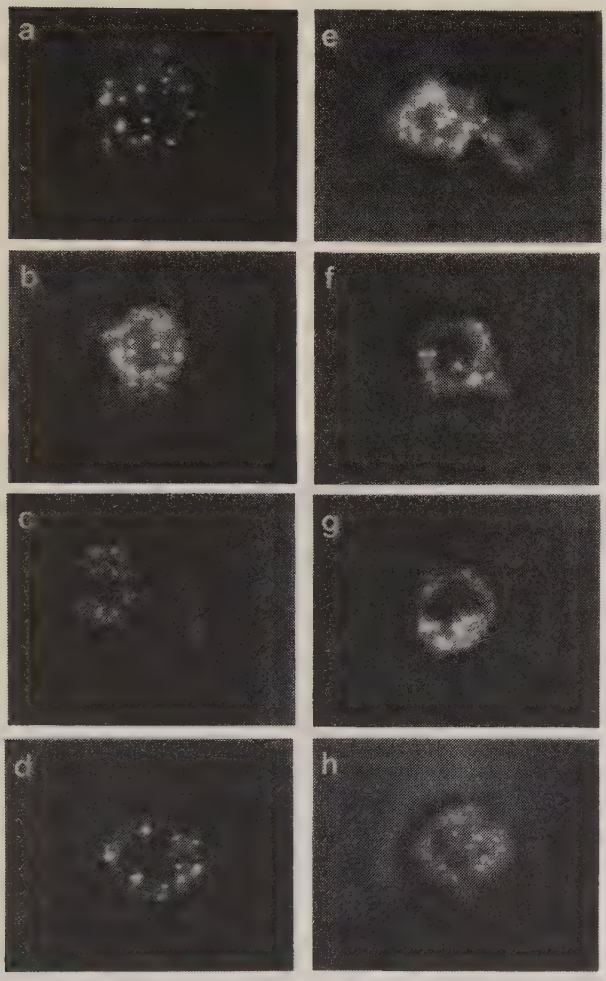


Abbildung 31

Autoradiographische Darstellung der Insulin-Rezeptor Komplexe (Gesamtbindung) auf Monozytenoberflächen.
Bindungsbedingungen und autoradiographische Bedingungen wie bei Abbildung 30.
Abbildung:Auflicht plus Durchlicht, Hellfeld, Ölimmersion.
Die Verteilung der Silberkörner erscheint bei einigen Zellen gleichmäßig (31 a und b) , bei vielen Zellen ungleichmäßig (31 c - h).

Für eine statistische Prüfung auf Ungleichverteilung müßte ein , der Zelldimension entsprechendes,kleines Zählraster von 5 - 10 μm^2 angewandt werden. Außerdem müßte die mittlere Silberkornanzahl pro Zählfeld etwa 5 betragen. Diese Forderungen können prinzipiell experimentell erfüllt werden, setzen aber erstens eine höhere Vergößerung der Abbildung und zweitens eine Überexposition der Autoradiogramme voraus. Autoradiographieserien, die dem Rechnung tragen , sind geplant. Hierbei ist an den routinemäßigen Einsatz der Raster-Elektronenmikroskopie gedacht.

2.6 Autoradiographie von Semidünnschnitten (Lichtmikroskopische Analyse)

Da bei Monozyten auch noch bei 15°C, wenn auch vermindert, Phagozytose nachweisbar ist, wäre denkbar, daß bei dieser Temperatur auch ein Teil des Labels in die Zelle aufgenommen wird. Deshalb haben wir zur Kontrolle Autoradiographien von Semidünnschnitten angefertigt. Mit Rücksicht auf die Zellgröße (Zellquerschnitt: 8-10 µm) haben wir im Gegensatz zu Hepatozyten nur 0.5 µm dicke Schnitte ausgewertet. Aus den folgenden Überlegungen geht jedoch hervor, daß nur eine sehr hohe Internalisierungsrate nachweisbar sein kann. Geht man von der gemessenen Radioaktivität aus (Tabelle 6) und nimmt an, daß 50 % des Labels in die Zelle aufgenommen wurden und homogen in der Zelle verteilt sind, so wäre das Signal nach 60 Tagen Exposition (= 1 Halbwertszeit) in der Größenordnung von 4-5 Silberkörnern pro Zellquerschnitt (ca. 50 μm^2) und gerade noch vom allgemeinen Hintergrund zu differenzieren.

Wären jedoch nur etwa 25 % des Labels internalisiert, so wäre das Signal 1-2 Silberkörner pro Zellquerschnitt und vom allgemeinen Hintergrund kaum mehr zu differenzieren. Für diese Abschätzung haben wir eine Zählausbeute von 20 % angenommen. Dieser Wert wurde von FERTUCK und SALPETER (1974) für ^{125}J-Strahlung in 0.5 um Schichten bei homogener Strahlquellenverteilung gemessen. Wir haben an den Zellquerschnitten keine über den Hintergrund hinausgehende Markierung beobachten können.

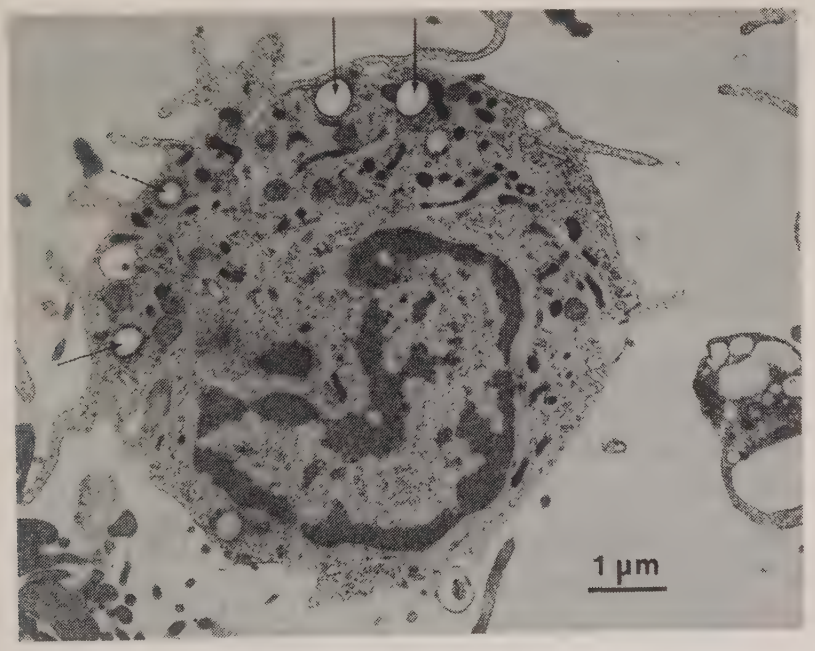


Abbildung 32

Phagozytose bei 15°C.

Eine Lymphozyten-Monozyten Population wurde mit 0.3 µm großen Latexpartikeln 120 min in isotonem Hank-BSA-Buffer, pH 7.4, inkubiert.

2.7 Kurze Zusammenfassung der autoradiographischen Ergebnisse

In der Lymphozyten / Monozyten-Population lassen sich nur auf Monozyten, die in der Regel 10- 20% der Zellpopulation ausmachen, Insulin-Rezeptor Komplexe nachweisen. Die gebundenen Insulinmoleküle sind offensichtlich ungleichmäßig auf der Zelloberfläche verteilt. "Cap"-artige Anordnungen der Silberkörner sind oft zu beobachten. Bei einer ^{125}J-Insulinkonzentration von 5×10^{-10} mol/l im Bindungsansatz wurde die Anzahl der pro Zelle gebundenen Insulinmoleküle auf 800 - 900 geschätzt und liegt somit pro Oberflächeneinheit in der gleichen Größenordnung wie bei Hepatozyten.

IV DISKUSSION

1. Validität der Methode

Um die Zahl und die Verteilung von Insulin-Rezeptor Komplexen auf Zelloberflächen zu bestimmen, wurde eine Autoradiographie von Zellausstrichpräparaten mit ^{125}J-Insulin als Tracer versucht.

Da einerseits ^{125}J γ- und ß-Strahlungen in verschiedenen Energiebereichen, mit verschiedenen Reichweiten emittiert, und da andererseits in einem Zellausstrich "dicke" Objekte, nämlich ganze Zellen mit einem Durchmesser von 10-20 um vorliegen, ist vorrangig die erzielbare autoradiographische Auflösung zu überlegen. Nur wenn die Strahlquellen, die auf der Zelloberfläche lokalisiert sind, signifikant höher zum Signal beitragen als Strahlquellen, die "irgendwo" im Zellvolumen lokalisiert sind, ist der experimentelle Ansatz sinnvoll.

Die meisten gebräuchlichen Photoemulsionen sind für die elektromagnetische Strahlung wenig empfindlich. Somit sind nur die Anteile der verschiedenen ß-Strahlungen für die Signalentstehung von Bedeutung. Die erwünschte Ortsinformation wird nur von den niederenergetischen Elektronen (3-4 KeV) infolge ihrer geringen Reichweite ($\sim$ 200 nm) vermittelt. Vom Signal der höherenergetischen Elektronen (23-34 KeV), deren mittlere Reichweite ca. 15 µm beträgt, kann nicht mit der erforderlichen Genauigkeit auf den Herkunftsort geschlossen werden. Diese Elektronen tragen in diesem Falle zum allgemeinen Rauschen bei und sollen daher mit möglichst geringer Empfindlichkeit registriert werden. Aus diesem Grunde sind dünne Photoschichten wünschenswert, da diese für Elektronen des Energiebereiches von

30-50 KeV wesentlich unempfindlicher sind als für niederenergetische Elektronen (BACHMANN und SALPETER 1967). Intention und präparationstechnische Konsequenz unterscheiden sich hierin von zahlreichen anderen autoradiographischen Studien an Zellausstrichen, die dicke Photoschichten (5-15 µm) einsetzen (z.B. ADA et al. 1966; ERTL et al. 1970; DÖRMER und THIEL 1975, 1976), um durch eine Beteiligung der 23-34 KeV Elektronen am Signal die Zerfälle in der ganzen Zelle mit möglichst hoher Ausbeute zu registrieren.

Mit einer Ilford L4 Monoschicht, wie sie bei den hier untersuchten Präparaten verwendet wurde, kann dagegen in einem Zellausstrichpräparat der Anteil der registrierten 23-34 KeV Elektronen bei 15 - 20 % gehalten werden. Werden beispielsweise bei Hepatozyten pro 100 μm^2 Zelloberfläche 18 Silberkörner registriert, so bedeutet das, daß 15 Silberkörner die Verteilung der Strahlquellen in der Zelloberfläche mit hoher Auflösung repräsentieren, während für 3 Silberkörner der Herkunftsort nicht zugeordnet werden kann. Obwohl dieser Anteil von höherenergetischen Elektronen nicht vernachlässigbar ist, wird das Verteilungsmuster nicht in dem Maße verunschärft, daß eine Differenzierung zwischen einer gleichmäßigen und einer ungleichmäßigen Verteilung nicht mehr möglich wäre.

In Zusammenfassung ergibt sich, daß die Autoradiographie von Zellausstrichen herangezogen werden kann, um ^{125}J-markierte Membrankomponenten auf der Zelloberfläche nachzuweisen. Bei Verwendung von dünnen Photo-

schichten ist die Bestimmung der Konzentration der markierten Membrankomponenten pro Flächeneinheit sowie eine Beschreibung ihrer Verteilung möglich, wobei zwischen einer gleichmäßigen Anordnung oder einer Anordnung in "patches" oder "caps" unterschieden werden kann.

Ein wesentliches präparationstechnisches Problem ist die Herstellung gleichmäßiger dünner Photoschichten über den Zellen. Eine ausreichende Beurteilung der Schichten war nur im Raster-Elektronenmikroskop möglich. Mit dieser Kontrolle war es relativ einfach, eine Stripping-Film-Technik zu entwickeln, die über den Zellkuppen eine homogene Dichtestpackung von Silberhalogenid-Kristallen routinemäßig garantiert und somit eine quantitative Auswertung der Autoradiogramme unter reproduzierbaren photographischen Bedingungen gewährleistet.

Die Analyse der Autoradiogramme von Zellausstrichpräparaten kann im Lichtmikroskop erfolgen. Die Identifizierung der einzelnen entwickelten Silberkörner, die sowohl unterschiedlich groß, als auch unterschiedlich kontrastreich sind, kann durch die Wahl geeigneter Einschlußmedien einerseits und durch die Art der Beleuchtung andererseits erleichtert werden. In Einschlußmitteln mit Brechwerten zwischen n = 1.4 und n = 1.5 werden erfahrungsgemäß die Lichtbrechungserscheinungen an den Oberflächenstrukturen der Zellen reduziert. Bei Verwendung von Durchlicht (Hellfeld) oder Interferenzkontrast heben sich die Silberkörner relativ kontrastreich von den gut erkennbaren Objektdetails ab. Zur Zählung der Silberkörner hat sich eine Mischbeleuchtung aus Hellfeld-Auflicht und Durchlicht

als günstig erwiesen. Die Zellen sind zwar nur als Schatten erkennbar, dafür sind jedoch die hell reflektierenden Silberkörner gut zu erkennen. Bei der Auswertung im Lichtmikroskop stört jedoch in jedem Falle die geringe Schärfentiefe. Je nach Zellgröße sind zur Darstellung eines möglichst großen Teils der Zellkuppe 2 oder 3 Aufnahmen in aufeinanderfolgenden Fokusebenen notwendig.

Alternativ kann zur Analyse der Autoradiogramme auch das Raster-Elektronenmikroskop eingesetzt werden. Die analytischen Möglichkeiten der Raster-Elektronenmikroskopie sind grundsätzlich als Vorteil zu werten, wenn sie auch wegen des hohen Zeitaufwandes routinemäßig nicht eingesetzt werden. In Präparaten, die zur Herstellung der Leitfähigkeit nur mit Kohle bedampft wurden, ist der Kontrast der Silberkörner groß genug, um sie mit ausreichender Sicherheit allein aufgrund des Kontrastes zu identifizieren. Das ließ sich durch Kontrollen mit der Röntgenanalyse belegen (Abbildung 8c). In Gold besputterten Präparaten ist die Kontrastdifferenz so stark vermindert, daß eine Identifizierung der Silberkörner ohne Zuhilfenahme der Elementanalyse unsicher wird.

Die große Schärfentiefe des Raster-Elektronenmikroskops ist bei der Auswertung von ganzen Zellen als der Hauptvorteil gegenüber der Lichtmikroskopie zu werten. Dagegen rechtfertigt der Erhaltungszustand der Präparate nicht die hohe Auflösung des Raster-Elektronenmikroskops. Nur relativ grobe Oberflächendetails, wie Zellausläufer, Falten, Invaginationen, werden durch die Präparationstechnik erhalten und können sicher über die lichtmikroskopische Auflösungsgrenze hinaus im Raster-Elektronenmikroskop dargestellt werden. Sie tragen zur Charakterisierung der Zelloberfläche,

wenn auch in beschränktem Maße, bei.

Der Einsatz des Raster-Elektronenmikroskops in der Autoradiographie wurde bereits von PAUL und BARTSCH (1970) und von HODGES und MUIR (1974 a,b) vorgeschlagen. HODGES und MUIR wiesen auf die analytischen Möglichkeiten, sowie auf die große Schärfentiefe des Raster-Elektronenmikroskops als Vorteile hin. Den Hauptvorteil sahen sie aber in der einfachen und zeitsparenden Präparation von Geweben für die Raster-Elektronenmikroskopie im Vergleich zu den wesentlich diffizileren Präparationstechniken für die Transmissions-Elektronenmikroskopie. Gerade dieses Argument ist jedoch wenig überzeugend, da bei der Autoradiographie im Transmissions-Elektronenmikroskop ein weitaus höheres Auflösungsvermögen erzielbar ist. Wir nehmen an, daß daher die Autoradiographie im Raster-Elektronenmikroskop als Alternative zur Transmissions-Elektronenmikroskopie keine Resonanz gefunden hat. Als Alternative zur Lichtmikroskopie sind jedoch eindeutig Vorteile zu erzielen. Da in zytobiologischen Laboratorien die Raster-Elektronenmikroskopie zunehmend Verbreitung findet, sehen wir hier ein neues Anwendungsfeld.

In Zusammenfassung ergibt sich, daß die photographischen Bedingungen und die Analysemöglichkeiten (Lichtmikroskop und Raster-Elektronenmikroskop) eine quantitative Auswertung der Autoradiogramme von Zellausstrichpräparaten ermöglichen.

Da sowohl für autoradiographische als auch für biochemische Untersuchungen ^{125}J-Insulin als Tracer verwendet wird, kann im Prinzip

jeder biochemische Bindungsansatz, bei beliebig wählbaren Inkubationsbedingungen, für die Autoradiographie weiterverarbeitet werden. Es müssen jedoch die biochemisch definierten Bindungsorte auch im autoradiographischen Präparat erhalten bleiben, wenn das Autoradiogramm eine valide morphologische Ergänzung zum biochemischen Rezeptornachweis darstellen soll.

Die biochemische und die autoradiographische Messung der Insulinbindung an den Rezeptor erfordern eine Trennung des freien von dem an die Zellen komplexierten Liganden. Da die Insulin-Rezeptor-Bindung reversibel ist, sind rasche Trennverfahren erforderlich. Während jedoch nach Abtrennung des freien Insulins für die biochemische Messung weder Erhaltungszustand der Zellen noch die ursprünglichen Bindungsorte des Insulins von Bedeutung sind, müssen für die Autoradiographie die Zellen erstens gut erhalten und zu Zellausstrichen weiterzuverarbeiten sein. Zweitens muß der Insulin-Rezeptor Komplex in situ fixierbar sein. Die Abtrennung der markierten Zellen vom freien Insulin über einen Dichtegradienten führt zu gut erhaltenen Zellsuspensionen, erfordert aber einen größeren Zeitaufwand. Es ist daher notwendig, bei niedrigen Temperaturen zu arbeiten, um die Dissoziation des Insulins vom Rezeptor so weit zu verzögern, daß sie für die Dauer des Trennungsverfahrens vernachlässigt werden kann. Wie unsere Messungen ergeben haben, werden nach Gradientenzentrifugation bei 4°C die gleichen Werte für die spezifische Insulinbindung erhalten, wie nach einer Trennung über Filter oder Sedimentation durch eine Ölschicht. Eine Fixierung der Insulin-Rezeptor Komplexe ist mit Glutaraldehyd möglich (JUNGER 1978). Kontrollmessungen bis zu 24 Stunden haben keine Instabilität der

Brückenbindung zwischen Insulin und Rezeptor gezeigt. Wir haben daher davon abgesehen, ein Reduktionsmittel wie z.B. Borhydrid (GACESCA und WHISH 1978) zur Reduktion der als Zwischenprodukt entstehenden Schiff'schen Basen einzusetzen.

Die Unterscheidung zwischen spezifisch gebundenem und unspezifisch gebundenem Insulin ist im Autoradiogramm ebenso problematisch wie bei der biochemischen Messung. Experimentell bietet sich nur die Möglichkeit, das Kriterium der biochemischen Messungen zu verwenden, nämlich den Restanteil an ^{125}J-Insulin, der in Gegenwert von einem 10^4fachen Überschuß an nativem Insulin noch gebunden wird, autoradiographisch darzustellen. Das Signal dieser unspezifischen Bindung und der von der Technik her bedingte Hintergrund der Photoemulsion werden als "Rauschen" klassifiziert, von dem sich die spezifische Bindung als "Signal" abhebt. Das erzielbare Signal/Rausch-Verhältnis bestimmt die Nachweisgrenze. Es soll anhand von Beispielen diskutiert werden.

In Autoradiogrammen von Hepatozyten wurden für einen Rezeptorbesatz entsprechend einer ^{125}J-Insulinkonzentration von 5×10^{-10} mol/l (SA 100 µCi/µg) nach einer Expositionszeit von 15 Tagen und nach Entwicklung in Mikrodol X durchschnittlich 16 Silberkörner pro 100 μm^2 Zelloberfläche bestimmt. Als unspezifische Bindung wurden im Mittel 3.5 Silberkörner pro 100 μm^2 Zelloberfläche gezählt. Das sind rund 22 % der Gesamtbindung. In beiden Autoradiographieserien (Gesamtbindung und unspezifische Bindung) betrug der Emulsionshintergrund 1.5 Silberkörner pro 100 μm^2, also 10 % der Gesamtbindung respektive 40 % der unspezifischen Bindung. Da wir die unspezifische Bindung inklusive Emulsions-

hintergrund als Rauschen bewerten, ergibt sich, daß etwa jedes 5. Silberkorn der Gesamtbindung keinen Insulin-Rezeptor Komplex repräsentiert und dem allgemeinen Rauschen zuzuordnen ist. Ungünstiger liegt das Signal/Rausch-Verhältnis bei Hepatozyten, deren Gesamtbindung unter sonst gleichen Bedingungen halb so groß ist (^{125}J-Insulinkonzentration 2.5 x 10^{-10} mol/l). In diesem Fall wurden im Mittel 8.3 Silberkörner pro 100 μm^2 Zelloberfläche gezählt. Die unspezifische Bindung betrug 2.6 Silberkörner pro 100 μm^2 Zelloberfläche. Das bedeutet, daß bereits jedes 3. Silberkorn dem Rauschen zuzuordnen ist. Der Emulsionshintergrund lag bei 1.8 Silberkörnern pro 100 μm^2; das sind 22 % der Gesamtbindung und 70 % der unspezifischen Bindung. Hier gewinnt der Einfluß des Emulsionshintergrundes allein bereits Gewicht. Falls es gelänge, diesen auf die Hälfte zu vermindern, könnte das Signal/Rausch-Verhältnis um den Faktor 2 verbessert werden.

Eine Erhöhung der spezifischen Radioaktivität des Tracers, hier am Beispiel von Lymphozyten und Monozyten aufgezeigt, führt ebenfalls zu einer wesentlichen Erhöhung des Signals gegenüber dem Rauschen. Nach einer Expositionszeit von 20 Tagen und Entwicklung in Mikrodol X wurde für die Gesamtbindung (^{125}J-Insulinkonzentration 5 x 10^{-10} mol/l, SA 167 µCi/µg) 14 Silberkörner pro 40 μm^2 gezählt. Die unspezifische Bindung lag bei < 1 Silberkorn pro 40 μm^2, der Emulsionshintergrund < 1 Silberkorn pro 40 μm^2. Das bedeutet, daß höchstens jedes 14. Silberkorn dem Rauschen zugezählt werden muß.

Für die Interpretation der Autoradiogramme ergeben sich in Zusammenfassung somit folgende Gesichtspunkte:

Es gelingt, biochemisch definierte Bindungsorte ins Autoradiogramm zu übertragen. Das Signal der spezifischen Insulinbindung hebt sich auch bei ^{125}J-Insulinkonzentrationen $< 5 \times 10^{-10}$ mol/l noch vom Rauschen (=unspezifische Bindung + Emulsionshintergrund) ab. Die Nachweisgrenze ist jedoch flexibel, da sie vom Emulsionshintergrund und der spezifischen Aktivität des Tracers mit bestimmt wird. Beide Parameter sind innerhalb gewisser Grenzen vom Experimentator zu beeinflussen. In der Praxis liegen die Einschränkungen einmal darin, daß die Lieferchargen der Photoemulsion unterschiedliche Hintergrundsraten aufweisen. Zum andern ist mit großen Schwankungsbreiten der spezifischen Radioaktivitäten zu rechnen ($\sim$ 100 - 200 µCi/µg), wenn ^{125}J-Insulin käuflich erworben werden muß und keine eigenen Jodierungsmöglichkeiten zur Verfügung stehen.

2. Erzielte Informationen über die Insulinbindung an Zellen

Die autoradiographischen Untersuchungen beschreiben die Insulinbindung bei 15°C und bei sogenannten physiologischen Insulinkonzentrationen (2.5×10^{-10} mol/l und 5×10^{-10} mol/l), so daß im Gleichgewicht etwa 10-20% aller verfügbaren Rezeptoren von Hepatozyten (LE CAM 1976) und knapp 40% aller verfügbaren Rezeptoren von Monozyten (Abbildung 28) besetzt sind. In diesem Insulinkonzentrationsbereich läßt sich für Hepatozyten die Insulinbindung noch durch eine Bindungskonstante beschreiben. Unter Berücksichtigung des "two site" Modells (KAHN et al. 1974) wäre vorwiegend

eine Qualität von Rezeptoren besetzt. Bei Monozyten wäre nach den Angaben von BECK-NIELSEN et al. (1977 und 1978) bereits die Beteiligung einer zweiten Qualität von Rezeptoren mit einzukalkulieren.

Bei diesen Bedingungen haben wir zwei isolierte Zellsysteme einander gegenübergestellt: Parenchymzellen (Hepatozyten) und Nichtparenchymzellen der Leber und Lymphozyten und Monozyten. In beiden Zellsystemen zeigen die verschiedenen Zelltypen gegenüber Insulin ein unterschiedliches Bindungsverhalten. Um außerdem einen Vergleich zwischen den beiden Zellsystemen herstellen zu können, betrachten wir im folgenden ausschließlich Versuche, die bei gleicher ^{125}J-Insulinkonzentration (5×10^{-10} mol/l) durchgeführt wurden.

Im Leberzellsystem stellen die Hepatozyten die Hauptfraktion(85%) dar. Da die empirisch beobachtete Verteilung der Silberkörner auf den Hepatozytenoberflächen gut mit einer Poissonverteilung übereinstimmt, können wir davon ausgehen, daß die Hepatozyten bezüglich des Rezeptorbesatzes eine relativ einheitliche Population darstellen, und daß die Strahlquellen (= Insulin-Bindungsstellen) auf der Oberfläche des einzelnen Hepatozyten gleichverteilt sind. Spezialisierte Rezeptordomänen schließen sich daher aus. Aus den beobachteten Korndichten läßt sich abschätzen, daß bei einer Zählausbeute von 40% (FERTUCK und SALPETER,1974) pro Hepatozyt im Mittel 8500 Insulinmoleküle (= Gesamtbindung minus Emulsionshintergrund) gebunden sind. Da 85 % der Silberkörner von niederenergetischen Elektronen verursacht werden (Siehe Seite 25),müssen, ebenfalls im Mittel, 7200 Insulinmoleküle auf der Zelloberfläche lokalisiert sein. Dagegen läßt sich von 1300 Insulinmolekülen der Bindungsort nicht

angeben. Andererseits sind von 8500 Insulinmolekülen etwa 7000 an spezifische Rezeptorstellen (= Gesamtbindung minus unspezifische Bindung minus Emulsionshintergrund) gebunden.

Ein völlig anderes Verhalten gegenüber Insulin zeigen Nichtparenchymzellen. Sie nehmen einen ungewöhnlich hohen Anteil von ^{125}J-Insulin auf. Aus derzeit laufenden Autoradiographieserien läßt sich abschätzen, daß pro Oberflächeneinheit etwa zehnmal mehr Insulin gebunden wird. Der unspezifisch gebundene ^{125}J-Insulin-Anteil liegt wesentlich höher als bei Hepatozyten. Trotz des 10^4fachen Überschusses an nativem Insulin ist der autoradiographisch nachweisbare Anteil an ^{125}J-Insulin so hoch, daß anzunehmen ist, daß die Hormonaufnahme bei $\sim 10^6$mol/l Insulin noch keiner Sättigung zustrebt. In Autoradiogrammen von der Gesamtbindung und von der unspezifischen Bindung erscheinen die Silberkörner unregelmäßig verteilt.

Aus elektronenmikroskopischen Untersuchungen wissen wir, daß die isolierte Fraktion der Nichtparenchymzellen vorwiegend aus Endothelzellen und Kupffer'schen Sternzellen und aus relativ wenigen Lipidspeicherzellen besteht. Da offensichtlich der größte Teil der Nichtparenchymzellen markiert ist und nur vereinzelt nichtmarkierte Zellen angetroffen werden, schließen wir, daß mindestens zwei Zelltypen Insulin gebunden haben. Von der Funktion her könnten es Endothelzellen und Kupffer'sche Sternzellen sein.

Der Versuch einer Bilanz ergibt folgendes Bild: Betrachten wir die die Gesamtbindung, so finden wir, wiederum bezogen auf eine Zählausbeute von 40% (FERTUCK und SALPETER 1974), im Autoradiogramm pro

Hepatozyt im Mittel ~ 8500 Insulinmoleküle gebunden. Insgesamt binden 10^6 Hepatozyten (= Standardpellet) 8.5×10^9 Moleküle oder 14.2×10^{-15} mol Insulin. Nehmen wir für die Nichtparenchymzellen, die etwa die Größe von Monozyten haben, eine Oberfläche von ca. 150 μm^2 an, so wären bei einer 10fach höheren Korndichte ca. 13000 Insulinmoleküle pro Zelle gebunden. 1.8×10^5 Nichtparenchymzellen (15 % der Leberzellen) haben dementsprechend 4×10^{-15} mol Insulin gebunden. Das bedeutet, daß autoradiographisch 75 % des komplexierten Insulins auf Hepatozyten (85 % der Zellen, 97 % der Zelloberfläche) und 25 % auf Nichtparenchymzellen (15 % der Zellen, 3 % der Zelloberfläche) nachweisbar sind. Insgesamt findet die Autoradiographie 60 % der im Standardpellet biochemisch gemessenen Radioaktivität wieder.

Die Rolle der Nichtparenchymzellen kann von zwei Gesichtspunkten aus überlegt werden. Zunächst unterscheidet sich die Wechselwirkung von Insulin mit den Bindungsstellen in der Plasmamembran der Nichtparenchymzellen offensichtlich von der spezifischen Insulin-Rezeptor Wechselwirkung. Es handelt sich vermutlich um eine unspezifische Hormonaufnahme, da selbst bei hohen Insulinkonzentrationen ($\sim 10^{-6}$ mol/l) offenbar noch keine Sättigung der Hormonaufnahme zu erzielen ist. Insgesamt ist jedoch die Hormonaufnahme so erheblich, daß sich die Frage nach der biologischen Relevanz stellt. Es wäre beispielsweise vorstellbar, daß Nichtparenchymzellen eine Funktion beim Insulinabbau in der Leber übernehmen. Die autoradiographischen Ergebnisse regen zu Studien dieser Fragen an. Eine Voraussetzung dafür sind jedoch stärker angereicherte Fraktionen von Nichtparenchymzellen.

Abgesehen von der biologischen Bedeutung muß der hohe Bindungsanteil der Nichtparenchymzellen die Analyse von biochemischen Bindungsdaten beeinflussen. Da in biochemischen Bindungsstudien mit Leberzellen die Fraktion der Nichtparenchymzellen nicht berücksichtigt wird und die Bindungsdaten auf Hepatozyten verallgemeinert werden, müssen die Schätzwerte für Rezeptorstellen prinzipiell zu hoch ausfallen. Wir bemühen uns derzeit,quantitative autoradiographische Daten von Nichtparenchymzellen zu erstellen. Damit sollte es möglich sein, den Beitrag dieser Zellen in einer Analyse der biochemischen Bindungsdaten nach SCATCHARD (1949) abzuschätzen. Eine Konsequenz ergibt sich aber schon jetzt: es empfiehlt sich, die Zellpopulation sorgfältig morphologisch zu charakterisieren, um den Anteil der Nichtparenchymzellen zu ermitteln. Der Gehalt an Nichtparenchymzellen kann nämlich, unseren Erfahrungen nach, je nach Aufschlußbedingungen während der Dissoziation des Lebergewebes unterschiedlich hoch ausfallen.

In einer über Dichtegradienten angereicherten Population von mononukleären Leukozyten stellen die Lymphozyten die Hauptfraktion (80 - 90 %). Im Autoradiogramm weisen sie keine Markierung auf, die über dem Niveau der unspezifischen Bindung und dem Emulsionshintergrund liegt. Dagegen können auf Monozyten, die nur 10 - 20 % der kernhaltigen Zellen ausmachen, Insulin-Rezeptor Komplexe autoradiographisch nachgewiesen werden. Aus der Anzahl der entwickelten Silberkörner läßt sich abschätzen, daß etwa 800 - 900 Insulinmoleküle pro Monozyt spezifisch gebunden werden. Erythrozyten, die gelegentlich als Verunreinigung beobachtet werden, sind nicht markiert.

BECK-NIELSEN et al. (1977) haben in biochemischen Untersuchungen die Insulinbindungskapazität von verschiedenen Blutzellen verglichen. Ausgehend von einer einheitlichen Zellzahl, wird im Vergleich zu der von Monozyten gebundenen ^{125}J-Insulinmenge von Granulozyten 1/14, von Lymphozyten 1/30, von Thrombozyten 1/60 und von Erythrozyten 1/300 gebunden.

Da in den von uns verwendeten Zellpopulationen praktisch keine Granulozyten vorkommen, kann bei einer Bilanz deren Bindungsanteil vernachläßigt werden. Ebenso ist der Anteil der Thrombozyten stark reduziert. Der Beitrag der Erythrozyten ist völlig unbedeutend. Dagegen fällt der Bindungsanteil von Lymphozyten infolge ihrer großen Anzahl bei der integralen Messung ins Gewicht. Nach den Angaben von BECK-NIELSEN et al. (1977) würden 25-30% der Gesamtradioaktivität auf Lymphozyten,die 80-90% der Zellpopulation stellen, entfallen, während Monozyten, die 10-20% der Zellpopulation ausmachen, 70-75% der Gesamtradioaktivität gebunden haben sollten. Für die autoradiographische Messung am einzelnen Lyphozyt liegt jedoch die Konzentration des gebundenen Insulins außerhalb der Nachweisgrenze . Bezogen auf die biochemisch gemessene Radioaktivität finden wir mit der Autoradiographie 50% der Gesamtradioaktivität auf Monozyten wieder. Das erscheint uns in Anbetracht der unterschiedlichen Meßmethoden eine zufriedenstellende Bilanz.

Ein Vergleich zwischen Monozyten und Hepatozyten zeigt, daß die Anzahl der Insulin-Rezeptor Komplexe pro Flächeneinheit in der gleichen Größenordnung liegt. Während aber bei Hepatozyten die Silberkörner, die die Orte der ^{125}J-Insulinmoleküle repräsentieren,

gleichmäßig über die gesamte Zelloberfläche verteilt ist,wird bei Monozyten häufig eine ungleichmäßige Verteilung des Labels beobachtet. Vor allem fallen "cap"-artige Anordnungen der Silberkörner auf. Da in einem Zellausstrich von Lymphozyten und Monozyten sowohl gleichmäßige als auch ungleichmäßige Verteilungsmuster abwechseln, können keine spezialisierten Rezeptordomänen in der Plasmamembran vorliegen. Wir interpretieren diese Verdichtungen von Silberkörnern als eine Folge der Lateralverschiebung von Rezeptoren in der Plasmamembran. Gerade bei dieser Zellart wird eine Umverteilung von Proteinen in der Membran häufig beobachtet (NICOLSON et al. 1977) . Ob die Segregation von Rezeptorstellen durch die Ligandenbindung induziert wurde, läßt sich aus den bisherigen Versuchen nicht ableiten. Wir können lediglich annehmen, daß "patch" und "cap"-Bildungen prinzipiell bei 15°C noch möglich sind, da bei dieser Temperatur, verzögert zwar, auch noch andere Vorgänge ablaufen, mit denen Umverteilungen von Plasmamembrankomponenten einhergehen, wie z.B. das Spreiten auf Glasoberflächen oder die Phagozytose von Latexpartikeln (Abbildung 32).

Zusammenfassend ergibt sich aus diesen ersten Befunden einerseits, daß mit der Autoradiographie von Zellausstrichen Informationen über Anzahl und Verteilung markierter Insulin-Rezeptor Komplexe erhalten werden können. In heterogenen Zellsystemen, wo die biochemische Messung nur verallgemeinern kann, wird mit der Autoradiographie eine Aussage über das Verhalten eines bestimmten Zelltyps

möglich. Durch Kontrollen der einzelnen Präparationsschritte haben wir versucht, die Quantifizierbarkeit der Experimente soweit abzusichern, daß eine Korrelation zum biochemischen Experiment prinzipiell möglich ist. Dadurch, daß eine biochemisch definierte Ligandenbindung bei beliebiger Parametervariation morphologisch untersucht werden kann, lassen sich zahlreiche Experimente planen. Der Einsatz der Methode muß sich außerdem nicht allein auf den Insulinrezeptor beschränken. Da die Jodierung von Peptiden und Proteinen mittlerweile zu einer Routinetechnik geworden ist, sehen wir mit der hier vorgestellten Autoradiographie von Zellausstrichen einen vielseitig modifizierbaren experimentellen Zugang zu morphologischen Studien über die Zeloberfläche.

V ZUSAMMENFASSUNG

Wenn es gelingt, den Rezeptor quantitativ am Einzelobjekt nachzuweisen, tragen morphologische Studien über den Insulinrezeptor zur Interpretation der biochemischen Bindungsanalyse bei. Das Ziel dieser Arbeit war, die Anzahl der unter definierten Bedingungen gebildeten Insulinrezeptor-Komplexe an isolierten Zellen zu bestimmen und ihre Verteilung auf der Zelloberfläche zu beschreiben. Mit diesen Daten sollten folgende Fragen geklärt werden:

(1) Sind alle Zellen eines Systems, unterschiedliche Zellspezies wie auch morphologisch gleich erscheinende Zelltypen, an der Insulinbindung beteiligt?

(2) Liegen die Bindungsanteile der Insulin-bindenden Zellen in der gleichen Größenordnung?

(3) Gibt es in der Plasmamembran spezialisierte Rezeptordomänen?

Die geringen Konzentrationen der Rezeptoren in der Plasmamembran und darüber hinaus die niedrige Besetzungsfrequenz bei physiologischen Insulinkonzentrationen lassen den morphologischen Nachweis von Insulin Rezeptor Komplexen zu einem methodischen Problem werden.
Für die Bearbeitung der oben gestellten Fragen hat die Spezifität des Tracers Priorität. Damit ist praktisch die Nachweismethode determiniert, da unter den derzeit zur Verfügung stehenden markierten Insulinen ^{125}J-Insulin und ^{3}H-Insulin mit ihren biologischen und immunologischen Eigenschaften dem nativen Insulin am nächsten kommen. Da durch Tritiierung des Insulins bisher nur spezifische

Radioaktivitäten von ~ 5 µCi/µg (HALBAN und OFFORD 1975) erreichbar sind, ist ^{125}J-Insulin, mit spezifischen Radioaktivitäten bis über 250 µCi/µg, vorzuziehen. Es kann außerdem autoradiographisch mit hoher Empfindlichkeit nachgewiesen werden (FERTUCK und SALPETER 1974). Da die Tracerkonzentration in Schnittpräparaten trotzdem noch zu gering wäre, um ein Verteilungsmuster der Insulin-Rezeptor Komplexe bei physiologischen Hormonkonzentrationen darzustellen, wurden Zellausstrichpräparate für die autoradiographischen Untersuchungen verwendet. Bei dieser Präparationsart wird im Vergleich zu Schnitten ein großer Teil der Zelloberflächen dargestellt.

In Zellausstrichpräparaten ist die Photoschicht nur mit den Zellkuppen in gutem Kontakt. In solchen Präparaten ist die für die Zielsetzung notwendige Auflösung dann gegeben, wenn das Signal zum überwiegenden Anteil von den Strahlquellen verursacht wird, die in diesem Abschnitt der Zelloberfläche lokalisiert sind. Nur das Signal der von ^{125}J emittierten niederenergetischen Elektronen (3-4 KeV, Reichweite ~ 0.2 µm) vermittelt die erwünschte Information vom Ort der Strahlquellen (= ^{125}J-Insulin-Bindungsstellen). Das Signal der ebenfalls von ^{125}J emittierten höherenergetischen Elektronen (23-34 keV, Reichweite ~ 15 µm) oder der γ-Strahlen kann zur Lokalisation der Rezeptorstellen nicht verwendet werden. Daher wurden die photographischen Bedingungen (Ilford L 4-Emulsion, Schichtdicke 150 nm) so gewählt, daß, der Strahlungscharakteristik des ^{125}J-Isotops Rechnung tragend, die niederenergetischen Elektronen mit hoher Empfindlichkeit, die höherenergetischen Elektronen mit wesentlich geringerer Empfindlichkeit registriert wurden. Die γ-Strahlung sollte unter diesen Bedingungen nicht registriert werden.

Die prozentualen Anteile der verschiedenen ß-Strahlungen und der γ-Strahlung am Signal wurden in Testpräparaten ermittelt. Durch Verwendung geeigneter Zwischenschichten zwischen Zellen und Photoschicht wurden einmal die niederenergetischen Elektronen und einmal die gesamten Elektronen weggefiltert. Daraus ergab sich, daß 85 % der entwickelten Silberkörner bei Verwendung von Ilford L4 Monoschichten (150 nm) und Mikrodol X-Entwicklung von den 3 - 4 KeV Elektronen stammen und nur 15 % von den 23 - 34 KeV Elektronen. γ-Strahlen tragen zum Signal nicht bei. Diese Werte wurden mit Zellen gemessen, bei denen keine Internalisierung des Labels nachzuweisen war. Bei einer hohen Internalisierungsrate können sich aufgrund der veränderten Strahlquellengeometrie die Anteile der verschiedenen ß-Strahlungen am Signal ändern. Sie können jedoch für jede Markierungssituation auf einfache Art bestimmt werden.

Um eine quantitative Auswertung der Autoradiogramme sicherzustellen, waren homogene Photoschichten erforderlich. Mit Hilfe rasterelektronenmikroskopischer Kontrollen wurde eine Stripping-Film-Technik entwickelt, mit der, gleichmäßig gepackte Silberhalogenid-Kristall-Schichten über den Zellen reproduzierbar hergestellt werden können. Der Stripping-Film ist mit den Zellkuppen in Kontakt, so daß nur dieser Bereich für Analysen verwendet werden kann.

Ein Vorteil der autoradiographischen Nachweismethode ist, daß der gleiche Tracer, der für biochemische Bindungsuntersuchungen eingesetzt wird, verwendet werden kann. Das bedeutet, daß aus dem gleichen Bindungsansatz der biochemische Meßwert und das autoradio-

graphische Präparat erstellt werden können. Da mit Glutaraldehyd die reversible Insulin- Bindung irreversibel verbrückt werden kann (JUNGER 1978), wird trotz der für die Autoradiographie notwendigen, zahlreichen Naßprozeduren definierte Bindungsorte des Insulins aufrecht erhalten. Eine Bilanz des Tracers während der kritischen Präparationsschritte hat gezeigt, daß die Insulinbindung im biochemischen und im morphologischen Präparat vergleichbar ist. Somit sind die experimentellen Voraussetzungen für eine quantitative Auswertung der Autoradiogramme gegeben.

Die Untersuchungen an Leberzellen haben zu folgendem Ergebnis geführt:

Die Zellpopulation bestand aus etwa 80 - 85 % Hepatozyten und 15 - 20 % Nichtparenchymzellen. Hepatozyten zeigen eine gleichmäßige Verteilung der Silberkörner auf der Zelloberfläche. Daraus kann auf eine gleichmäßige Verteilung der Rezeptorstellen geschlossen werden. Spezialisierte Rezeptordomänen in der Plasmamembran können ausgeschlossen werden. Bei einer ^{125}J-Insulinkonzentration von 5 x 10^{-10} mol/l im Bindungsansatz sind im Autoradiogramm der Gesamtbindung bei 65% aller Hepatozyten Korndichten von 12-18 Silberkörnern pro 100/um^2 Zelloberfläche beobachtet worden; 25% weisen höhere Korndichten auf, 10% geringere. Aufgrund der Korndichteverteilung sehen wir die isolierten Hepatozyten in Bezug auf den Rezeptorbesatz eine einheitliche Population an. Bezogen auf die Oberfläche eines luftgetrockneten Hepatozyten werden im Durchschnitt 7000-8500 Insulinmoleküle gebunden. 6000 -7000 Insulinmoleküle sind spezifisch an Insulinrezeptoren gebunden. Bei einer ^{125}J- Insulinkonzentration von 2.5 x 10^{-10} mol/l im Bindungs-

ansatz werden etwa nur halb so viele Rezeptorstellen vom Hormon besetzt. Die angegebenen Werte basieren auf einer autoradiographischen Zählausbeute von 40 % - 50%.
Nichtparenchymzellen weisen ein völlig anderes Bindungsverhalten als Hepatozyten auf. Sie sind etwa zehnmal höher markiert, zeigen aber auch eine sehr hohe unspezifische Bindung. Insgesamt läßt sich abschätzen, daß Hepatozyten die 80-85% der Zellpopulation ausmachen, 75 % des Tracers gebunden haben, während Nichtparenchymzellen, die mit 15-20% in der Zellpopulation vertreten sind, 25 % des Tracers aufgenommen haben. In einer biochemischen Bindungsanalyse dieses Zellsystems würden somit ohne Berücksichtigung dieser Verteilung die Rezeptorstellen von Hepatozyten zu hoch geschätzt. Eine Internalisierung des Tracers konnte weder bei Hepatozyten noch bei Nichtparenchymzellen nachgewiesen werden.

Die Untersuchungen an Lymphozyten und Monozyten haben zu folgenden Ergebnissen geführt:
Die Zellpopulation bestand aus 88 % Lymphozyten und 12 % Monozyten. Nur bei etwa 10 - 15 % aller Zellen lassen sich Insulinrezeptor-Komplexe nachweisen. Die markierten Zellen zeigen die Strukturmerkmale der Monozyten. Auf einige Zellen sind die Silberkörner gleichmäßig verteilt. Auf vielen Zellen werden Anhäufungen von Silberkörner, teilweise "cap"-artig beobachtet. Da sowohl gleichmäßige als auch ungleichmäßige Verteilungsmuster beobachtet werden, schließen wir spezialisierte Rezeptordomäne in der Plasmamembran aus. Eine Segregation von Rezeptorstellen in der Plasmamembran ist aber offenbar möglich. Die Anzahl der Insulinrezeptor-Komplexe wird auf 800-900 pro Monozyt geschätzt (Zählausbeute 33%) und liegt pro Flächeneinheit in der gleichen Größenordnung wie bei Hepatozyten.

VI LITERATUR

ADA,G.L., HUMPHREY,J.H., ASKONAS,B.A., Mc DEVITT,H.O. and NOSSAL, G.J.V.: Correlation of grain counts with radioactivity (^{125}I and tritium) in autoradiography. Exp. Cell Res. 41, 557-572 (1966).

ATKINS,H.L.: Radionuclides and the endocrine system. In: Handbook of Radioactive Nuclides. Ed. Y.Wang. The Chemical Rubber Co., Cleveland, Ohio 1969, p.395-422.

BACHMANN,L. and SALPETER,M.M.: Absolute sensitivity of electron microscope radioautography. J.Cell Biol. 33, 299-305 (1967).

BECK-NIELSEN,H., PEDERSEN,O., KRAGBALLE,K. and SCHWARTZ-SØRENsen,N.: The monocyte as a model for the study of insulin receptors in man. Diabetologia 13, 563-569 (1977).

BECK-NIELSEN,H., PEDERSEN,O. and SCHWARTZ-SØRENSEN, N.: Effects of diet on the cellular insulin binding and the insulin sensitivity in young healthy subjects. Diabetologia 15, 289-296 (1978).

BERGERON,J.J.M., LEVINE,G., SIKSTROM,R., SLAUGHNESSY,D.O., KOPRIWA,B., NADLER,N.J. and POSNER,B.I.: Polypeptide hormone binding sites in vivo: initial localization of ^{125}I-labeled insulin to hepatocyte plasmalemma as visualized by electron microcope radioautography. Proc. Natl. Acad. SCI USA 74, 5051-5055 (1977).

BERGERON,J.J.M., SIKSTROM,R., HAND,A.R. and POSNER,B.I.: Binding and uptake of ^{125}I-insulin into rat liver hepatocytes and endothelium. J.Cell Biol. 80, 427-443 (1979).

BERRY,M.N. and FRIEND ,D.S.: High yield preparation of isolated rat liver parenchymal cells. J. Cell Biol. 43, 506-520 (1969).

BESSIS,M.: Living blood cells and their ultrastructure. Springer Verlag, Berlin-Heidelberg-New York, 1973.

BIENER,J., JANSEN,F.K. and BRANDENBURG,D.: Insulin labelled by coupling with peroxidase. Diabetologia 9, 53-55 (1973).

BLACKARD,W.G. and NELSON,N.C.: Portal and peripheral vein immunoreactive insulin concentrations before and after glucose infusion. Diabetes 19, 302-306 (1970).

BLANCHARD,R.F., DAVIS,P.J. and BLAS,S.D.: Physical characteristics of insulin receptors on renal cell membranes.
Diabetes 27, 88-95 (1978).

BOLDT,D., SKINNER, A.M. and KORNFIELD,S.: Studies of two subpopulations of human lymphocytes differing in responsiveness to concanavalin A.
J.Clin.Invest. 51, 3225-3234 (1972).

BØYUM ,A.: Separation of leucocytes from blood and bone marrow.
Scand. J.Clin.Lab.Invest. 21, (Suppl. 97) 1-108 (1968).

BØYUM,A.: Separation of blood leucocytes, granulocytes and lymphocytes.
Tissue Antigens 4, 269-274 (1974).

BØYUM,A.: Isolation of lymphocytes, granulocytes and macrophages.
Scand.J.Immunol. 5, (Suppl. 5) 9-15 (1976).

LeCAM, A., FREYCHET,P. and LENOIR,P.: Degradation of insulin by isolated liver cells.
Diabetes 24, 566-573 (1975).

LeCAM,A., GOUILLOUZO,A. and FREYCHET,P.: Ultrastructural and biochemical studies of isolated adult rat hepatocytes prepared under hypoxic conditions.
Exp.Cell Res. 98, 382-395 (1976).

CARO,L.G. and van TUBERGEN,R.P.: High-resolution autoradiography. I Methods.
J.Cell Biol. 15, 173-188 (1962).

CARPENTIER,J.L., GORDEN,Ph., AMHERDT,M., van OBBERGHEN,E.,KAHN, C.R. and ORCI,L. : ^{125}I-insulin binding to cultured human lymphocytes: initial localization and the fate of hormone determined by quantitative electron microscopic autoradiography.
J.Clin.Invest. 61, 1057-1070 (1978).

CARPENTIER,J.L., GORDEN,Ph., BARAZZONE, Ph., FREYCHET,P., LeCAM, A. and ORCI, L.: Intracellular localization of ^{125}I-labeled insulin in hepatocytes from intact rat liver.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 76, 2803-2807 (1979 a).

CARPENTIER,J.L., GORDEN,Ph., FREYCHET,P., LeCAM, A.: Lysosomal association of internalized ^{125}I-insulin in isolated rat hepatocytes .
J.Clin.Invest. 63, 1249-1261 (1979 b).

CUATRECASAS,P.: Insulin-receptor interactions in adipose tissue cells: direct measurement and properties.
Proc.Natl. Acad. Sci.USA 68, 1264-1268 (1971).

CUATRECASAS,P.: Affinity chromatography and purification of the insulin receptor of liver cell membranes.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 69, 1277-1281 (1972).

CUATRECASAS,P. and HOLLENBERG,M.D.: Membrane receptors and hormone action.
Adv. Prot. Chem. 30, 251- 451 (1976). Review.

ECKEL, J. and REINAUER,H.: Characteristics of insulin receptors in the heart muscle: binding of insulin to isolated muscle cells from adult rat heart.
Biochim.Biophys. Acta submitted.

EHRLICH,P.: Über den jetzigen Stand der Chemotherapie"
Ber. d.D. Chem. Ges. 42, 17-47 (1909).

ERTL,H.H., FEINENDEGEN,L.E. and HEINIGER,H.J.: Iodine-125, a tracer in cell biology: physical properties and biological aspects.
Phys. Med. Biol. 15, 447-456 (1970).

FERTUCK, H.C. and SALPETER,M.M.: Sensitivity in electron microscope autoradiography for ^{125}I.
J. Histochem. Cytochem. 22, 80-87 (1974).

FISHER,K.A. and BRANTON,D.: Freeze-fracture autoradiography: feasibility .
J.Cell Biol. 70, 453-458 (1976).

FREYCHET,P., KAHN,C.R., ROTH,J. and NEVILLE, D.M. jr.: Insulin interactions with liver plasma membranes.
J.Biol.Chem. 247, 3953-3961 (1972).

FREYCHET,P.: The interactions of proinsulin with insulin receptors on the plasma membrane of the liver.
J.Clin.Invest. 54, 1020-1031 (1974).

FREYCHET,P., ROSSELIN,G., RANCON,F., FOUCHEREAU,M. and BROER,Y.: Interactions of insulin and glucagon with isolated rat liver cells. Binding of the hormones to specific receptors.
Horm. Metab. Res. Suppl. 5, 72-78 (1974).

FREYCHET,P.: Interactions of polypeptide hormones with cell membrane specific receptors: studies with insulin and glucagon.
Diabetologia 12, 83-100 (1976). Review.

GACESA,P. and WHISH,W.J.D.: The immobilization of adenine nucleotides on polysaccharides by using glutaraldehyde coupling and borohydride reduction.
Biochem. J. 175, 349-352 (1978).

GAMMELTOFT,St. and GLIEMANN,J.: Binding and degradation of ^{125}I-labelled insulin by isolated rat fat cells.
Biochim.Biophys. Acta 320, 16-32 (1973).

GAMMELTOFT, St., ØSTERGAARD KRISTENSEN,L., and SESTOFT,L.: Insulin receptors in isolated rat hepatocytes.
J.Biol. Chem. 253, 8406-8413 (1978).

GAMMELTOFT,St., ØSTERGARD KRISTENSEN,L., FOLKE,M. and SESTOFT,L.: Regulation of insulin receptors in isolated hepatocytes from normal and streptozotocin-diabetic rats in the fed and 48 h fasted state.
in: Insulin. Chemistry, structure and function of insulin and related hormones . Second International Insulin Symposium, Aachen, F.R.of Germany, 1979. Proceedings.
Walter de Gruyter & Co , Berlin-New York.

GAVIN,J.R.III, ROTH,J., JEN,Ph. and FREYCHET,P.: Insulin receptors in human circulating cells and fibroblasts.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 69, 747-751 (1972).

GAVIN,J.R.III,GORDEN,Ph., ROTH,J., ARCHER,J.A. and BUELL,D.N.: Characteristics of the human lymphocyte insulin receptor.
J.Biol. Chem. 248, 2202 -2207 (1973).

GINSBERG,B.H.,KAHN,C.R., ROTH,J. and De MEYTS,P.: Insulin-induced dissociation of its receptor into subunits: possible molecular concomitant of negative cooperativity.
Biochem.Biophys. Res. Commun. 73, 1068-1074 (1976).

GLIEMANN,J. GAMMELTOFT,St. and VINTEN,J.: Time course of insulin receptor bindung and insulin-induced lipogenesis in isolated rat fat cells.
J.Biol. Chem. 250, 3368-3374 (1975).

GLIEMANN,J. and SONNE,O.: Binding and receptor-mediated degradation of insulin in adipocytes.
J.Biol. Chem. 253, 7857-7863 (1978).

GOLDFINE,I.D. ,SMITH,G.J.,WONG,K.Y. and JONES,A.L.: Cellular uptake and nuclear binding of insulin in human cultured lymphocytes: evidence for potential intracellular sites of insulin action.
Proc. Natl. Acad.Sci. USA 74,1368-1372 (1977).

GOLDFINE,I.D., JONES,A.L., HRADEK,G.T., WONG,K.Y. and MOONEY,J.S.: Entry of insulin into human cultured lymphocytes : electron microscope autoradiographic analysis.
Science 202, 760-763 (1978).

GORDEN,Ph.,CARPENTIER,J.L., FREYCHET,P. and LeCAM , A.: Intracellular translocation of Iodine-125-labeled insulin: direct demonstration in isolated hepatocytes.
Science 200, 782-785 (1978).

HACKENBROCK,Ch.R.: Chemical and physical fixation of isolated mitochondria in low-energy and high energy states.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 61, 598-605 (1968).

HALBAN,Ph.A. and OFFORD,R.E.: The preparation of a semisynthetic tritiated insulin with a specific radioactivity of up to 20 Curies per millimole.
Biochem. J. 151, 219-225 (1975).

HANSEN,B., LINDE,S., SONNE,O. and GLIEMANN,J.: Monoiodoinsulin specifically substituted in Tyr A 14 or Tyr A 19.
in: Insulin. Chemistry, structure and function of insulin and related hormones. Second International Insulin Symposium , Aachen,F.R. of Germany, 1979. Proceedings.
Water de Gruyter & Co, Berlin-New-York.

HECHTER,O.: Hormone action at the cell membrane. In: Mechanisms of hormone action. Ed. P.Karlson. Academic Press, New york-London, 1965, p.61-82.

HODGES,G.M. and MUIR,M.D.: Autoradiography of biological tissues in the scanning electron microscope.
Nature 247, 383-385 (1974).

HODGES,G.M.,CARBONELL,A.W., MUIR,M.D. and GRANT,P.R.: Uses and limitations of scanning electron microscope autoradiography.
Scanning Electron Microscopy / 1974 (Part I). Proceedings of the Seventh Annual Scanning Electron Microscope Symposium IIT Research Institute, Chicago Illinois 60616, USA, 1974, 159-166.

JARETT,L. and SMITH,R.M.:Electron microscopic demonstration of insulin receptors on adipocyte plasma membranes utilizing a ferritin-insulin conjugate.
J.Biol. Chem. 249, 7024-7031 (1974).

JARETT,L. and SMITH,R.M.: The natural occurence of insulin re - ceptors in groups on adipocyte plasma membranes as de - monstrated with monomeric ferritin-insulin.
J.Supramolec. Struct. 6, 45-59 (1977).

JENNESSEN,R.K.: Markierung von negativen Festladungen auf Zelloberflächen mit kationisiertem Ferritin.Einsatzmöglichkeiten und Grenzen.
Doktorarbeit, 1981

JUNGER,E.: Autoradiographic demonstration of insulin binding sites on cell surfaces.
Cytobiologie 16, 250-258 (1978).

KAHN,C.R., FREYCHET,P., ROTH,J. and NEVILLE,D.M.Jr.: Quantitative aspects of the insulin-receptor interaction in liver plasma membranes,
J.Biol.Chem. 249, 2249-2257 (1974).

KAHN,C.R.: Membrane receptors for hormones and neurotransmitters.
J.Cell Biol. 70, 261-286 (1976). Review.

KAHN,C.R. and BAIRD,K.: The fate of insulin bound to adipocytes.
J.Biol.Chem. 253, 4900-4906 (1978).

KATZ,N. and JUNGERMANN,K.: Autoregulatory shift from fructolysis to gluconeogenesis.
Hoppe Seyler's Z. Physiol.Chem. 357, 359-375 (1976).

O'KEEFE,E. and CUATRECASAS,P.: Insulin receptors in murine mammary cells: comparison in pregnant and nonpregnant animals.
Biochim.Biophys. Acta 343, 64-77 (1974).

KOPRIWA,B.M.: A semiautomatic instrument for the radioautographic coating technique.
J.Histochem.Cytochem. 14, 923-928 (1967).

KOSHLAND,D.E.Jr., NÉMETHY, G. and FILMER,D.: Comparison of experimental binding data and theoretical models in proteins containing subunits.
Biochemistry 5, 365-385 (1966).

KRUG,V., KRUG,F. and CUATRECASAS,P.: Emergence of insulin receptors on human lymphocytes during in vitro transformation.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 69, 2604-2608 (1972).

KÜHN,L., MEYER,H. and REINAUER,H.: Distinct properties of insulin receptor proteins following resolution by hydrophobic interaction chromatography.
In: Insulin. Chemistry, structure and function of insulin and related hormones. Second International Insulin Symposium, Aachen F.R.of Germany, 1979.Proceedings.
Walter de Gruyter & Co, Berlin-New-York.

LAND,B.R.,PODELSKI,T.R.,SALPETER,E.E. and SALPETER,M.M.: Acetylcholine receptor distribution on myotubes in culture correlated to acetylcholine sensitivity.
J.Physiol. 269,155-176 (1977).

LANGLEY,J.N.: On the physiology of the salivary secretion.
J.Physiol.(London) 1, 339-369 (1878).

LEVINE,R.: Cell membrane as a primary site of insulin action.
Feder.Proc. 25, 1071-1073 (1965).

LEVITZKI,A., SEGEL,L.A. and STEER,M.L.: Co-operative response of oligomeric protein receptors coupled to non-co-operative ligand binding.
J.Mol.Biol. 91, 125-130 (1975).

LIQUIER-MILWARD,J.: Electron microscopy and radioautography as coupled techniques in tracer experiments.
Nature 177, 619 (1956).

MARINETTI,G.V.,LESKO,L. and KORETZ,S.: Initial reactions occuring in the cell plasma membrane following hormone binding.
In: Perspectives in membrane biology. Ed.:Estrada,S.O. and Gitler,C. Academic Press , New-York- San Francisco-London, 1974 p. 455-493.

DeMEYTS,P.,ROTH,J.,NEVILLE,D.M.Jr., GAVIN,J.R.III, and LESNIAK, M.A.: Insulin interactions with its receptor: experimental evidence for negative cooperativity.
Biochem. Biophys.Res.Commun. 55, 154-161 (1973).

DeMEYTS,P. and ROTH,J.: Cooperativity in ligand binding: a new graphic analysis.
Biochem.Biophys.Res.Commun. 66, 1118-1126 (1975).

DeMEYTS,P.: Insulin and growth hormone receptors in human cultured lymphocytesand peripheral blood monocytes.
In: Methods in receptor research . Ed.: M.Blecher
Marcel Dekker Inc. New-York and Basel, 1976a,Part I p. 301-383.

DeMEYTS,P.: Cooperative properties of hormone receptors in cell membranes.
J. Supramolec. Struct. 4, 241-258 (1976 b).

DeMEYTS,P. BIANCO,A.R. and ROTH,J.: Site-site interactions among insulin receptors. Characterization of the negative cooperativity.
J. Biol. Chem. 251, 1877-1888 (1976).

MONOD,J. WYMAN,J. and CHANGEUX,J.P.: On the nature of allosteric transitions: a plausible model.
J.Mol.Biol. 12, 88-118 (1965).

NICOLSON,G.L., POSTE,G. and JI, T.H.: The dynamics of cell membrane organization.
Cell Surface Reviews 3, 1-73 (1977). Ed.: Poste,G. and Nicolson,G.L. North -Holland Publishing Company, Amsterdam.

OLEFSKI J.M. and REAVEN,G.M.: The human lymphocyte: a model for the study of insulin-receptor interaction.
J. Clin. Endocr. 38, 554-560 (1974).

OLEFSKI,J.M., JOHNSON,J. LIU,F., EDWARDS,P. and BAUR,S.: Comparison of ^{125}I-insulin binding and degradation to isolated rat hepatocytes and liver membranes.
Diabetes 24, 801-810 (1975).

OLEFSKI,J.M. and CHANG,H.: Insulin binding to adipocytes. Evidence for functionally distinct receptors.
Diabetes 27, 946-958 (1979).

PAUL,D.,GRÖBE,A. and ZIMMER,F.: Autoradiography in the scanning electron microscope.
Nature 227,488-489 (1970).

PELC,S.R., COOMBES,J.D. and BUDD,G.C.: On the adaption of autoradiographic techniques for the use with the electron microscope.
Exp. Cell Res. 24, 192-195 (1961).

PENTTILA,A.,KALIMO, H. and TRUMP,B.F.: Influence of glutaraldehyde and/or osmium tetroxide on cell volume, ion content, mechanical stability, and membrane permeability of Ehrlich ascites tumor cells.
J.Cell Biol. 63, 197-214 (1974).

DePIERRE,J.W. and KARNOVSKY, M.C.: Plasma membranes of mammalian cells.
J.Cell Biol.56 , 275-303 (1973).Review.

REVEL,J.P. and HAY,E.D.: An autoradiographic and electron microscopic study of collagen synthesis in differentiating cartillage.
Z.Zellforschung 61, 110-144 (1963).

ROGERS,A.W.: Techniques of autoradiography.
Elsevier Publishing Company, Amsterdam-London-New-York, 1967.

RÖSEN,P., EHRICH,B.,JUNGER,E., BUBENZER, H.J. and KÜHN,L.: Binding and degradation of insulin by plasma membranes from bovine liver isolated by a large scale preparation.
Biochim.Biophys. Acta 587, 593-605 (1979).

ROTH,J. : Peptide hormone binding to receptors : a review of direct studies in vitro.
Metabolism 22, 1059-1073 (1973). Review .

ROUILLER,C. and JEZEQUEL,A.M.: Electron microscopy of the liver.
In: The liver, Morphology, Biochemistry, Physiology.
Ed.: Rouiller,C. Academic Press, New York, 1965, Vol.I,p. 195-264.

RUBIN,M.M. and CHANGEUX,J.P.: On the nature of allosteric transitions: implications of non-exclusive ligand binding.
J.Mol. Biol. 21, 265-274 (1966).

SALPETER,M.M. and BACHMANN,L.: Autoradiography with the electron microscope. A procedure for improving resolution, sensitivity and contrast.
J. Cell Biol. 22, 469-477 (1964).

SALPETER,M.M.,FERTUCK,H.C. and SALPETER,E.E.: Resolution in electron microscope autoradiography. III. Iodine-125, the effect of heavy metal staining and a reassessment of critical parameters.
J. Cell Biol. 72, 161-173 (1977).

SALPETER,M.M., McHENRY,F.A. and SALPETER,E.E.: Resolution in electron microscope autoradiography. IV. Application to analysis of autoradiographs.
J. Cell Biol. 76, 127-145 (1978).

SCATCHARD, G.: The attractions of proteins for small molecules and ions.
Ann.N.Y.Acad. Sci. 51, 660-672 (1949).

SCHWARTZ,R.H., BIANCO,R.,HANDWERGER,B.S. and KAHN,C.R.: Demonstration that monocytes rather than lymphocytes are the insulin binding cells in preparations of human peripheral blood mononuclear leucocytes: implications for studies of insulin resistant states in man.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 72, 474-478 (1975).

SHECHTER,Y., SCHLESSINGER, J.,JACOBS,St., CHANG,K.J. and CUATRECASAS,P.: Fluorescent labeling of hormone receptors in viable cells: preparation and properties of highly fluorescent derivatives of epidermal growth factor and insulin.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 75, 2135-2139 (1978).

SINGER,S.J. and NICOLSON,G.L.: The fluid mosaic model of the structure of cell membranes.
Science 175, 720-731 (1972).

SODOYEZ, J.C., SODOYEZ-GOFFAUX,F. GOFF,M.M., ZIMMERMANN,A.E. and ARQILLA,E.R.: ^{127}I or carrier-free ^{125}I monoiodoinsulin. Preparation, physical, immunological and biological properties and susceptibility to"insulinase" degradation.
J.Biol. Chem. 250, 4268- 4277 (1975).

SOLL,A.H., GOLDFINE ,I.D., ROTH,J. and KAHN,C.R.: Thymic lymphocytes in obese (ob/ob) mice.
J.Biol. Chem. 249, 4127-4131 (1974).

SOLL,A.H., KAHN,C.R. and NEVILLE,D.M.Jr. : Insulin binding to liver plasma membranes in the obese hyperglycemic (ob/ob) mouse.
J.Biol. Chem. 250, 4702-4707 (1975).

STEINER,D.F.: Insulin today.
Diabetes 26, 322-340 (1977).

TENNANT,J.R.: Evaluation of the trypan blue technique for de - termination of cell viability.
Transplantation 2, 685-694 (1964).

TERRIS,S. and STEINER,D.F.: Binding and degradation of ^{125}I - insulin by rat hepatocytes .
J. Biol. Chem. 250, 8389-8398 (1975).

TERRIS,S. and STEINER,D.F.: Retention and degradation of ^{125}I- insulin by perfused livers from diabetic rats.
J.Clin. Invest. 57, 885-896 (1976).

THIEL,E., DÖRMER,P., RODT,H. and THIERFELDER,S.: Quantitative immunoautoradiography at the cellular level. I. Design of a microphotometric method to quantitate membrane antigens on single cells using ^{125}I- labeled antibodies.
J.Immunol. Methods 6, 317-330 (1975).

THIEL,E. DÖRMER,P. , RUPPELT,W. and THIERFELDER,S.: Quantitative immunoautoradiography at the cellular level. II. Absolute measurements using labeled standard cells as a source of reference.
J.Immunol. Methods 12, 237-251 (1976).

VARANDANI,P.T. and NAFZ,M.A. : Insulin degradation. XVI. Evidence for the sequential degradative pathway in isolated liver cells.
Diabetes 25,173-179 (1976).

WILLIAMSON, J.R. and van den BOSCH,H. : High resolution autoradiography with stripping film.
J.Histochem.Cytochem. 19, 304-309 (1971).

WISHER,M.H. and EVANS,W.H. : Functional polarity of the rat hepatocyte surface membrane.
Biochem. J. 146, 375-388 (1975).

VII ANHANG

1. Radioisotope

Insulin-(J-125), Insulin vom Schwein , SA 100 - 170 uCi/ug , (Hoechst AG, Frankfurt/Main)

Insulin-(J-125) iodiert (Peroxidase) und gelchromatographisch nachgereinigt, SA 150 - 300 uCi/ug

2.Insuline

Schweineinsulin (Hoechst AG, Frankfurt/Main) gelchromatographisch nachgereinigt, eingesetzt zur Jodierung.

Actrapid^{R} (Novo Industrie GmbH,Mainz)

3.Chemikalien

Collagenase Type I , Worthington Biochemical Corp.

Epon 812
Glutaraldehyd 25%
Hepes^{R}
Rinder Serumalbumin, Cohn Fraktion V
Osmiumtetroxyd, Serva Heidelberg

Liquemin^{R}, Roche

Lymphoprep^{R}, Nyegaard & Co, Oslo

Percoll^{TM}, Pharmacia Fine Chemicals, Uppsala

Gurr's Mounting Medium, Deutsche Schwab Reagenzien GmbH, Villmar-Aumenau

Alle übrigen Reagenzien wiesen den Reinheitsgrad "pro analysi" auf.

4. Photochemikalien

Nuclear Research Emulsion L4, Ilford

AR-10 Stripping Film
Mikrodol X, Kodak

Natriumthosulfat p.a.
Kalumbisulfit,p.a., Merck, Darmstadt.

5. Pufferlösungen

Krebs-Ringer-BicarbonatPuffer zur Isolierung der Leberzellen:

pH, 7.4, 280 mosmol

Die Pufferlösung wurde in folgenden Varianten verwendet:

a) Ca^{2+}-frei mit einem Zusatz von 0.5% Rinderserumalbumin zur Dissoziation des Lebergewebes

b) Mit 5 mmol Ca^{2+} pro 1 und einem Zusat von 1% Rinderserumalbumin zur Reinigung und Anreicherung der Hepatozyten.

Hepes^{R}-Medium zur Insulinbindung an Leberzellen

pH 7.4, 280 mosmol

Natriumchlorid	0.140 mol/l
Kaliumchlorid	0.005 mol/l
Calciumchlorid	0.0012 mol/l
Hepes^{R}	0.010 mol/l

Die Pufferlösung wurde mit einem Zusat von 1% Rinderserumalbumin verwendet.

Hank-Puffer zur Isolierung der Lymphozyten und Monozyten

pH 7.4 , 280 mosmol

Die Pufferlösung wurde in folgenden Varianten verwendet:

a) plus 0.54 mol Natriumchlorid pro 1 , zur Verdünnung des Vollbluts

b) plus 1% Rinderserumalbumin, plus 5IE Heparin pro ml , zur Anreicherung und Reinigung der mononukleären Zellen

c) plus 1% Rinderserumalbumin, zum Waschen der Zellpopulation nach dem zweiten Reinigungsschritt.

Hepes^{R}-Medium zur Insulinbindung an Lymphozyten und Monozyten

pH 7.8, 300 mosmol

Hepes^{R}	0.069 mol/l
Natriumchlorid	0.083 mol/l
Kaliumchlorid	0.0035 mol/l
Magnesiumsulfat .7 H_2O	0.0008 mol/l
Natriumacetat	0.010 mol/l
EDTA	0.0007 mol/l

Die Pufferlösung wurde mit einem Zusatz von 1% Rinderserum - albumin verwendet.

6. Gradientenmedien

Lymphoprep^{R}

ϱ = 1.077 g/ ml

Wurde unverdünnt beim ersten Reinigungsschritt der mononukleären Blutzellen eingesetzt.

Percoll^{TM}

Ausgangslösung: 9 VT Percoll^{TM}
= L I 1 VT Natriumchloridlösung 1.2 mol/l

Die Asugangslösung wurde auf pH 7.4 eingestellt. Die Lösung hat 280 mosmol und eine Dichte von 1.125g/ml.
Davon ausgehend wurden durch Verdünnung mit Hank-Puffer (pH7.4, 280 mosmol) Percoll^{TM}-Lösungen folgender Dichten hergestellt:

L I	1.125 g/ ml	n= 1.3520
55.5 VT L I +44.5 VT Hank	1.107 g/ ml	n= 1.3440
46 VT L I +54 VT Hank	1.106 g/ ml	n= 1.3425
30 VT L I +70 VT Hank	1.104 g/ ml	n= 1.3400

7. Versuchsansätze zur Insulinbindung

	Gesamtbindung	unspez. Bindung
^{125}J-Insulin	100/ul	100/ul
Actrapid^{R}	-	100/ul
Bindungspuffer	400/ul	300/ul
Zellsuspension	1000/ul	1000/ul

Zellkonzentration im Ansatz:
Leberzellen 10^6 pro ml
Lymphozyten/Monozyten 20-30 x 10^6 pro ml

Zur Inkubation wurden 1.5 ml Eppendorf-Plastik Röhrchen verwendet. Während der Inkubationszeit wurden die Röhrchen in einem thermostatisierten Wasserbad langsam gedreht, um die Zellen in Suspension zu halten.

Herr Professor Dr.H. REINAUER hat diese Arbeit stets unterstützt und mit Interesse verfolgt. Aus zahlreichen Diskussionen habe ich von ihm wertvolle Anregungen erhalten. Ich möchte ihm an dieser Stelle herzlichst danken.